

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA DE MÉDICO CIRUJANO  
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



EFFECTO DEL USO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES EN  
RELACIÓN AL TAMAÑO Y NÚMERO DE ADIPOCITOS, INFILTRACIÓN  
LEUCOCITARIA Y EXPRESIÓN DE LIPOCALINA 2 EN EL TEJIDO ADIPOSEO EN  
UN MODELO MURINO

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

PRESENTA:

M.P.S.S. JESUS ZEPEDA MUÑOZ

DIRECTORES DE TESIS:

IRAZÚ CONTRERAS GARCÍA, PH. D.  
JOSÉ ANTONIO ESTRADA GUADARRAMA, PH.D.

REVISORES DE TESIS:

KEILA ISAAC OLIVÉ, PH. D.  
ALEXANDRA SOTO PIÑA, PH. D.

TOLUCA DE LERDO, ESTADO DE MÉXICO, 2018

EFFECTO DEL USO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES EN  
RELACIÓN AL TAMAÑO Y NÚMERO DE ADIPOCITOS, INFILTRACIÓN  
LEUCOCITARIA Y EXPRESIÓN DE LIPOCALINA 2 EN EL TEJIDO ADIPOSO EN  
UN MODELO MURINO

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, la doctora Irazú Contreras García y el doctor José Antonio Estrada Guadarrama por otorgarme el privilegio de poder contar con su ayuda, por su esfuerzo y dedicación, y por sus horas de trabajo entregadas a este proyecto.

Gracias a los expertos, la doctora Keila Isaac Olivé y la doctora Alexandra Soto Piña, cuya colaboración fue decisiva para la consolidación este trabajo; por su retroalimentación para la mejora y perfeccionamiento del mismo, y por su amabilidad en todo momento.

Gracias a la Universidad Autónoma del Estado de México y a la Facultad de medicina por darme la oportunidad de estudiar la Licenciatura de Médico Cirujano, así como abrirme las puertas a su círculo científico y académico para el propio crecimiento profesional.

Agradecimientos de todo corazón a mi familia en general, y principalmente a mis abuelos, Encarnación Zepeda Reyes y María de la Luz Hernández Campos por su esfuerzo y apoyo para lograr mis objetivos, y a mis padres, Ma. Cristina Muñoz y Jesús Manuel Zepeda por haberme dado la disciplina suficiente para superar mis metas.

Finalmente gracias al Laboratorio de Neuroquímica de la Universidad Autónoma del Estado de México y a sus integrantes, compañeros y amigos por su gran ayuda y asesoría a lo largo de este proyecto.

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1.	EDULCORANTES.....	4
3.1.1.	DEFINICIÓN DE EDULCORANTE.....	4
3.1.2.	CLASIFICACIÓN DE LOS EDULCORANTES.....	4
3.1.3.	EDULCORANTES Y REGULACIÓN DEL APETITO.....	5
3.1.4.	¿EDULCORANTES COMO PROMOTORES DE OBESIDAD?.....	6
3.1.5.	CARACTERÍSTICAS DE LOS EDULCORANTES NO CALÓRICOS	9
3.2.	GENERALIDADES DEL TEJIDO ADIPOSO.....	12
3.2.1.	TEJIDO ADIPOSO UNILOCULAR.....	12
3.2.2.	TEJIDO ADIPOSO MULTILOCULAR .....	14
3.2.3.	DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL .....	14
3.2.4.	FACTORES ADIPOGÉNICOS Y ANTIADIPOGÉNICOS .....	15
3.3.	INTERACCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	16
3.3.1.	GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	16
3.3.2.	INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA .....	16
3.3.3.	PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNITARIAS EN EL TEJIDO ADIPOSO .....	17
3.4.	PROCESO INFLAMATORIO .....	19
3.4.1.	INFLAMACIÓN AGUDA .....	19
3.4.2.	INFLAMACIÓN CRÓNICA .....	20
3.4.3.	TNF-ALFA EN EL TEJIDO ADIPOSO DURANTE EL PROCESO INFLAMATORIO .....	21
3.4.4.	PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA DEL TEJIDO ADIPOSO .....	22

3.5.	PAPEL DE LA LIPOCALINA 2 EN EL PROCESO INFLAMATORIO CRÓNICO DEL TEJIDO ADIPOSO .....	23
3.5.1.	¿QUÉ ES LA LIPOCALINA 2? .....	23
3.5.2.	ANÁLISIS DE LOS GENES Y MOLÉCULAS DE LIPOCALINA .....	23
3.5.3.	ROL DE LA LIPOCALINA EN LA REGULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN .....	24
3.5.4.	RELACIÓN DE LA LIPOCALINA 2 CON EL TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y VISCERAL .....	26
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
4.1.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	28
5.	JUSTIFICACIÓN .....	29
6.	OBJETIVO GENERAL .....	31
6.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
7.	HIPÓTESIS .....	32
8.	MÉTODO .....	33
8.1.	DISEÑO DE ESTUDIO .....	33
8.2.	UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA .....	33
8.3.	MODELO EXPERIMENTAL .....	33
8.3.1.	CEPA BALB/C .....	34
8.3.2.	CONDICIONES DE CRIANZA .....	34
8.3.3.	DATOS BIOLÓGICOS.....	35
8.4.	ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS EXPERIMENTALES Y OBTENCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO PARA SU ANÁLISIS POR MICROSCOPIA .....	35
8.5.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	36
8.6.	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	36
8.7.	OBTENCIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO .....	37
8.8.	FIJACIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA .....	38
8.9.	CORTES EN PARAFINA .....	38
8.10.	TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA .....	39
8.11.	TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	40

8.12.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	41
9.	RESULTADOS .....	43
10.	FIGURAS Y LEYENDAS DE FIGURAS .....	48
11.	DISCUSIÓN .....	57
12.	CONCLUSIONES .....	60
13.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	61
14.	BIBLIOGRAFÍA .....	62

## 1. RESUMEN

Se piensa que los edulcorantes implementados en productos de la industria alimentaria pueden provocar obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus, al actuar por mecanismos moleculares y fisiológicos a nivel de tejido adiposo, generando inflamación crónica, aumento de celularidad y aumento de volumen por célula del tejido adiposo.

El objetivo de este trabajo fue el determinar tamaño y número de adipocitos en tejido adiposo gonadal y mesentérico, así como infiltrado leucocitario en un modelo murino de suplementación con edulcorantes artificiales y naturales, nutritivos y no nutritivos. Para este fin, se realizó un estudio experimental con tejido adiposo de ratones de la cepa BALB/c, empleando microscopia óptica y de fluorescencia para evaluar la morfología y número de adipocitos, número de leucocitos infiltrados en el tejido adiposo gonadal y mesentérico y la intensidad media de fluorescencia de lipocalina-2; proteína sintetizada como citocina/adipocina con efectos antiinflamatorios a nivel tisular en respuesta a procesos inflamatorios crónicos.

Nuestros resultados demostraron que la suplementación crónica con edulcorantes afecta el tamaño y número de adipocitos de un modelo murino, con una tendencia de mayor tamaño en la suplementación con sacarosa y glucósidos de esteviol, y una disminución del mismo con sucralosa. De forma contraria, se observó una disminución de leucocitos en el grupo suplementado con glucósidos de esteviol y aumentado en sucralosa y sacarosa. Asimismo, observamos la influencia de los edulcorantes sobre la expresión de lipocalina-2 a nivel de tejido adiposo gonadal y mesentérico, con una tendencia a mayor expresión en animales suplementados con sacarosa, y menor expresión con glucósidos de esteviol. De forma general, se observó que la suplementación crónica con edulcorantes promueve el incremento del tamaño adipocítico e infiltración leucocitaria, además de la expresión de lipocalina-2 en ratones, esto podría predecir efectos similares en humanos y su influencia en el desarrollo de la obesidad.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la época contemporánea, las enfermedades crónico degenerativas se han posicionado como una causa importante de muerte a nivel internacional, solo después de los accidentes, que ocupan la primera causa de mortalidad, resaltando a su vez la morbimortalidad que ocasionan sus complicaciones y secuelas, no siendo nuestro país la excepción a dicha estadística (1). Entre dichas enfermedades se contemplan la obesidad, diabetes mellitus y la resistencia a la insulina. Se sabe que las causas de incidencia elevada de estas enfermedades en su mayoría son multifactoriales, residiendo principalmente en una dieta cada vez mas desbalanceada a expensas de un mayor contenido calórico con menor contenido proteico, sumado a un estilo de vida con predisposición cada vez mayor al sedentarismo con poca actividad física y un modo de producción en la industria y empleos con incluso nula actividad (2).

Motivo de ello y con el fin de disminuir la mortalidad a nivel mundial, distintas empresas de la industria alimenticia han implementado en sus productos la utilización de edulcorantes sustitutos de la sacarosa para igualar el nivel de dulzura y a su vez disminuir su contenido energético, disminuyendo la prevalencia de obesidad y mortalidad por sus complicaciones; sin embargo, pocos estudios han evidenciado la influencia *in vivo* de dichos edulcorantes y su acción en la disminución de obesidad y sobrepeso. Por tal motivo, diferentes investigaciones han tratado de estudiar los mecanismos moleculares, a nivel histológico y por anatomía patológica, para encontrar evidencia sobre la verdadera utilidad de edulcorantes nutritivos y no nutritivos.

Nuestro estudio se ha dirigido al análisis de diferentes edulcorantes utilizados por la industria alimenticia para determinar algunos de sus efectos sobre el tejido adiposo gonadal y mesentérico en ratones de la cepa BALB/c, tomando en cuenta las características morfológicas y el número de adipocitos en estos tejidos, además de la densidad de infiltración leucocitaria en los mismos. Por otro lado, se analizó la relación de la expresión de lipocalina-2 en tejido adiposo al tratamiento crónico de edulcorantes, que se piensa está implicada en la disminución de la inflamación crónica durante la



obesidad siendo un aspecto fundamental de esta citocina la promoción de tolerancia a la glucosa y respuesta a la insulina por parte de los tejidos dependientes de la misma, entre ellos y con gran importancia por su rol en la obesidad, el tejido adiposo propiamente dicho (3).

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. EDULCORANTES**

##### **3.1.1. DEFINICIÓN DE EDULCORANTE**

El término edulcorante hace referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar el efecto dulce del principal edulcorante conocido, la sacarosa o azúcar de mesa y que, habitualmente, aporta menor energía (4). Algunos son extractos naturales, mientras que otros son sintéticos. En este último caso se denominan edulcorantes artificiales. El nuevo patrón de consumo, caracterizado por el consumo elevado de alimentos procesados con modificaciones que afectan el contenido en grasa y azúcares, se aleja notablemente del patrón alimentario mediterráneo. En este sentido, los alimentos edulcorados muestran una expansión exponencial tanto en los de aporte energético pleno como en aquellos supuestamente reducidos en energía. La presión industrial en estos patrones de consumo de alimentos juega un papel fundamental, por lo que resulta esencial clarificar las posiciones de eficacia, y seguridad de estas sustancias para trasladar una información clara a los consumidores (5).

##### **3.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS EDULCORANTES**

Los edulcorantes se clasifican en función de su contenido calórico (calórico o no calórico), según su origen (natural o artificial) o según su estructura química, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1: Clasificación básica de los edulcorantes (4).**

<b>Clasificación de edulcorantes</b>			
Calóricos	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, maltosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco, jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz, caramelo
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol, lactitol, glicerol.
No-calóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Stevia, taumatina, pentadina, minelina
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, ciclamato.

### **3.1.3. EDULCORANTES Y REGULACIÓN DEL APETITO**

#### **ESTIMULACIÓN DE FASE ENCEFÁLICA DE LOS EDULCORANTES**

La estimulación de fase encefálica supone una serie de reacciones de respuesta dentro de un organismo a nivel metabólico y mecánico, resaltando el papel propio del aparato digestivo, que se prepara para la llegada de alimentos y que lleva a cabo el proceso digestivo, absorción de nutrientes y colocación de los mismos en torrente sanguíneo para la disposición del resto de las células del organismo. La estimulación encefálica incluye el propio condicionamiento y aprendizaje por motivos psicológicos y la estimulación directa por nutrientes dentro de la cavidad oral y sentido del gusto, a través de la estimulación de las papilas gustativas, cuyos nervios sensoriales, nervio glossofaríngeo (noveno par craneal), vago (décimo par craneal) y facial (séptimo par

craneal), conducen la información de gustativa al tracto solitario, al tálamo y a la ínsula de Reil, ubicada en el extremo inferior de la circunvolución poscentral de la corteza cerebral (6).

Al respecto, algunas investigaciones sostienen la hipótesis de que la falta de activación de la respuesta de fase encefálica puede incrementar el riesgo de obesidad, y contrariamente, otras plantean que la activación de respuestas en fase encefálica, a partir de ingerir o simplemente con la exposición a alimentos dulces, puede resultar problemático pues estimula tanto el apetito como el consumo de alimentos (7).

## **EFFECTOS NUTRITIVOS Y OSMÓTICOS**

Se sabe que el estómago proporciona señales de apetito, basándose principalmente en el volumen que pueda estar o no dentro del mismo, mientras que por el contrario, el intestino es más sensible a las señales de presencia de nutrientes, si bien esta hipótesis no parece cumplirse de forma rígida como implica la presencia de osmoreceptores a nivel intestinal y quimorreceptores a nivel gástrico (6). Aquellas bebidas que contienen edulcorantes calóricos contienen más energía en relación a la carga osmótica encontrada; no obstante, la carga osmótica puede ser igual respecto a algunas bebidas con edulcorantes no calóricos o incluso menor (8).

### **3.1.4. ¿EDULCORANTES COMO PROMOTORES DE OBESIDAD?**

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{Kg/m}^2$ ). En el caso de los

adultos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como se indica a continuación (9).

- Sobrepeso: IMC entre 25-29.
- Obesidad: IMC igual o superior a 30.

El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, pues es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, hay que considerarla como un valor aproximado, porque puede no corresponderse con el mismo nivel de grosor en diferentes personas. Desde 1980, la incidencia de obesidad se ha incrementado en más del doble en todo el mundo. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos (10). Para el mismo año, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas (11). La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal. En 2014, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos (12).

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas. A nivel mundial ha ocurrido un aumento en la ingestión de alimentos de alto contenido calórico que son ricos en grasa, sumado a un descenso en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización (11). A menudo los cambios en los hábitos alimentarios y de actividad física son consecuencia de cambios ambientales y sociales asociados al desarrollo, así como de la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud, la agricultura, el transporte, la planificación urbana, el medio ambiente, el procesamiento, distribución y comercialización de alimentos, y la educación (13).

Diversos estudios indican que varios edulcorantes no nutritivos pueden ayudar en la disminución de la incidencia y progresión de la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 debido a sus características endulzantes con menor aporte calórico con el subsecuente menor almacén de grasas y carbohidratos y producción de la insulina para la

estimulación de anabolismo (14). Otros estudios sugieren que varios edulcorantes no nutritivos, entre ellos glucósidos de esteviol, sucralosa, sacarina y aspartamo, pueden paradójicamente dirigir la ganancia de peso en diferentes situaciones, por ejemplo, en un estudio en ratas que consumieron líquidos endulzados con sacarina se comprobó que tuvieron un incremento en el consumo de alimentos y mayor ganancia de peso, comparado con ratas que consumieron líquidos endulzados con glucosa; en controversia con individuos que consumieron glucósidos de esteviol, un edulcorante no nutritivo natural proveniente de la planta *Stevia rebaudiana*, quienes tuvieron significativamente menores niveles de glucosa postprandial que los que consumieron sacarosa, mientras que los que consumieron sacarosa resultaron en ganancia de peso (15,16).

En un estudio que utilizó ratones incluidos en un programa de alimentación a base de dieta alta en grasas (*high-fat diet*, HFD), el tratamiento suplementario con sacarosa disminuyó el consumo diario de alimentos e incrementó la ganancia de peso en ratones obesos. Además, incrementó la ganancia neta de masa de tejido adiposo blanco y tamaño de los adipocitos incluidos en éste. Por otro lado, el suplemento con edulcorantes no nutritivos incrementó la masa de tejido adiposo blanco, en comparación con el grupo control, además se vieron incrementados los niveles de de glucosa sérica en el grupo tratado con sacarosa. Los niveles de leptina en tejido adiposo blanco fueron significativamente más altos en ratones obesos tratados con edulcorantes no nutritivos, en comparación con los ratones controles, esto pudiera significar que la suplementación con edulcorantes puede propiciar el incremento en la obesidad en humanos y no su disminución como se ha pensado (15).

### 3.1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS EDULCORANTES NO CALÓRICOS

#### GLUCÓSIDOS DE ESTEVIOL

La *Stevia rebaudiana* es una pequeña planta perenne que crece hasta 65-80 cm de altura, con hojas sésiles, dispuestas de manera opuesta. Las diferentes especies de *Stevia* contienen varios compuestos dulcificantes potenciales, siendo *S. rebaudiana* la más dulce de todas (16).

Las hojas de *Stevia* contienen una mezcla compleja natural de ocho glicósidos de diterpeno dulces, incluyendo isoestevioles, esteviósidos, rebaudiósidos, esteviolbiósidos y dulcósida A. De los diversos glicósidos de esteviol (SGs), esteviósido y rebaudiósido A son los principales metabolitos de uso comercial, siendo estos compuestos de 250 a 300 veces más dulces que la sacarosa. Tienen propiedades sensoriales y funcionales superiores a las de muchos otros edulcorantes de alta potencia y es probable que se conviertan en una fuente importante de edulcorante natural para el creciente mercado de alimentos. Son capaces de ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana lo que los ha convertido en un área interesante de investigación en nuestros días (17). Han sobresalido entre los edulcorantes por sus amplias aplicaciones médicas, antimicrobianas, antimicóticas, antihipertensivas, antihiperoglucémicas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (16). El extracto de hoja de *Stevia* se ha utilizado tradicionalmente en el tratamiento de la diabetes. Su ingestión causa una ligera supresión de los niveles de glucosa en plasma y un aumento significativo de la tolerancia a la insulina en humanos adultos normales, además, los SG tienen un efecto potenciador sobre la secreción de insulina al actuar directamente sobre las células  $\beta$  sin alterar la actividad del canal de  $K^+/ATP$  y el nivel de cAMP en los islotes de Langerhans, documentando así al esteviósido y el esteviol como potentes agentes antihiperoglucémicos (18). Por otro lado, el esteviósido puede regular los niveles de glucosa en sangre aumentando no sólo la secreción de insulina, sino también la utilización de insulina en ratas con deficiencia de insulina (16).

La obesidad es el trastorno nutricional más común; es un estado de exceso de acumulación de grasa en el cuerpo. En términos clínicos, la obesidad es una condición de exceso de peso corporal superior al 20% por encima del peso corporal ideal. En los últimos años, el sobrepeso y la obesidad han aumentado notablemente y los factores que contribuyen incluyen un entorno social que apoya la inactividad física, el consumo excesivo de alimentos y las opciones de alimentos poco saludables (2). El sobrepeso y la obesidad, es un factor de riesgo importante asociado con un gran número de problemas de salud incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, diabetes, riesgos quirúrgicos, problemas pulmonares y renales, complicaciones del embarazo y cierto tipo de cáncer (3). Los edulcorantes de *Stevia* en alimentos y bebidas ofrecen alternativa de uso por su calidad baja en calorías, lo que ayudaría como medida de control de peso y promoción de la disminución del mismo. Recientemente se ha demostrado que la ingestión de esteviol en altas dosis promueve la reducción en el peso corporal, como se ha experimentado en ratas (19).

## **SUCRALOSA**

La sucralosa es un edulcorante obtenido a partir de sacarosa en el que tres grupos hidroxílicos de las posiciones 4, 1 y 6 se sustituyen por 3 átomos de cloro para formar el compuesto 4,1',6'-triclora galactosacarosa, también conocido como 1,6-dicloro-1,6,4-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido, a menudo abreviado en la nomenclatura química como 4,1',6'-trideoxi-galacto-sacarosa (20). El consumo de sucralosa se ha incrementado por su composición no calórica, estable a altas temperaturas y en medio ácido y no hidrolizable incluso durante la digestión o metabolismo en virtud de la extrema estabilidad de sus enlaces carbono-cloro (21). Presenta la importante característica de no interactuar químicamente con otros alimentos, siendo estable en presencia de etanol y capaz de ser almacenado por más de un año, manteniendo el 99% de su sabor original (20).



Otra característica de la sucralosa es la no interferencia en la utilización y absorción de glucosa, el metabolismo de los carbohidratos y la secreción de insulina, por lo tanto, es una sustancia segura que puede ser ingerida por pacientes diabéticos, sin estimular la secreción de insulina ni reducir la concentración plasmática de glucosa (22). Además, los estudios clínicos concluyeron que la sucralosa no es ni acidogénica ni cariogénica (23). A principios de 1998, la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés), después de evaluar 110 estudios en animales y seres humanos, aprobó la sucralosa como aditivo alimentario en 15 variedades de alimentos y bebidas (24). En 1999, esta aprobación se extendió a su utilización como edulcorante para uso general en todos los alimentos, bebidas convencionales, suplementos vitamínicos dietéticos y dietas médicas (25).

Se ha comprobado que cuando la sucralosa se administra por vía intravenosa a ratas a una dosis de 2 a 20 mg/Kg de peso corporal, se excreta hasta un 80% por la orina y 9% a 16% a través de las heces; sin embargo, cuando se administra por vía oral a dosis de 10 a 1000 mg/Kg, la excreción urinaria es inferior al 5%, lo que demuestra que la sucralosa está mal absorbida en el tracto intestinal y es casi totalmente excretada en forma inalterada a través de las heces en las primeras 24 horas, independientemente de la dosis y el sexo de los animales (26). Un estudio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington utilizó 17 sujetos a los que se les aplicó una dosis única 48 mg de sucralosa en 60 mL de agua, demostrando mayor secreción de insulina (20%), mayores niveles de glucosa y una disminución en la aclaración de insulina (7%), indicando de esta forma una disminución de la sensibilidad a la insulina respecto a los controles (27). Dado que el uso de la sucralosa, uno de los edulcorantes más nuevos de alto poder edulcorante, ha ido aumentando gradualmente, se necesitan nuevos estudios para atestiguar su consumo seguro (28).

### **3.2. GENERALIDADES DEL TEJIDO ADIPOSO**

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado que cumple una función importante en la homeostasis energética. Sus células funcionales son los adipocitos, que almacenan el exceso de energía en forma de triacilgliceroles, una forma dinámica de almacenamiento de energía. Los adipocitos regulan el metabolismo energético mediante la secreción de señales autocrinas, paracrinas y endocrinas. Existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo unilocular o blanco que predomina en seres humanos adultos y el multilocular o pardo (29).

#### **3.2.1. TEJIDO ADIPOSO UNILOCULAR**

El tejido adiposo unilocular (en donde los lípidos se almacenan en un solo compartimento) o blanco forma una capa llamada panículo adiposo o hipodermis en el tejido conjuntivo subcutáneo del abdomen, región glútea, axila y muslo. Sus localizaciones internas son el omento mayor, mesenterio, espacio retroperitoneal, plantas y palmas y pericardio visceral. Dentro de sus funciones se encuentra el aislamiento térmico, amortiguar los órganos vitales y secreción hormonas, entre ellas, adiponectina, leptina y mediadores de la inflamación siendo su principal función el almacenaje de energía en forma de triglicéridos, cuyo porcentaje en el citoplasma de esta célula puede ser de hasta un 90% (30). La morfología propia de estas células se caracteriza por ser unilocular, esferoidal, con núcleo aplanado, borde de citoplasma y diámetro grande (15 a 150  $\mu\text{m}$ ) (29). Sus principales factores de transcripción son el PPAR-gamma, un receptor nuclear cuya activación es capaz de estimular la movilización de la reserva lipídica, y el RXR, un receptor nuclear activado por el ácido retinoico, aunque con menor relevancia (30). Presenta mitocondrias poco desarrolladas, pocas fibras nerviosas simpáticas, pocos vasos sanguíneos y lipogénesis disminuida como respuesta al frío (29).

La cantidad de tejido adiposo en una persona está determinada por dos sistemas fisiológicos: uno asociado a la regulación de peso a corto plazo y otro relacionado a largo plazo (31). El primero controla el apetito y el metabolismo en forma cotidiana, regulando la ingestión de alimentos y la producción de energía de un organismo durante el día. Las hormonas que se relacionan con este efecto son la ghrelina, la cual es una hormona sintetizada por la mucosa del estómago con efecto orexígeno que actúa a través de receptores en el hipotálamo para aumentar la sensación de hambre y con ello promover la ingestión de calorías y la recuperación de los depósitos de energía para producción de trabajo subsecuentemente y el péptido tirosina tirosina (PYY), un péptido encontrado en las células L de la mucosa intestinal que suprime el apetito, inhibe la motilidad gástrica e incrementa la absorción de agua y electrolitos en el colón, además de suprimir la función pancreática (30).

El segundo sistema que controla el metabolismo y el apetito de forma prolongada es a través de la insulina (hormona anabolizante por excelencia producida esencialmente en las células beta del páncreas endocrino) y la leptina, hormona liberada por el tejido adiposo cuya función consiste en suprimir los efectos de hormonas orexigénicas y estimular la función de las hormonas anorexigénicas a nivel del hipotálamo (31). La deficiencia de leptina aumenta la ingestión de alimento, comprobado con la crianza de ratones cuya deficiencia total de dicha hormona o en su defecto la ausencia de su receptor a nivel hipotalámico se ha relacionado con mayor ingestión calórica y con ello mayor incidencia de obesidad (30).

## **MOVILIZACIÓN DE DEPÓSITOS LIPÍDICOS**

La movilización de los depósitos de grasa por vía nerviosa es de particular importancia durante los periodos de ayuno y de exposición a frío intenso. La movilización por vía endocrina comprende un sistema complejo de hormonas y sistemas que controla la liberación de ácidos grasos desde los adipocitos. Tales hormonas comprenden las propias de la glándula tiroides, esteroides suprarrenales, glucagón y hormona de

crecimiento (31). Durante este proceso, los triacilglicerolos son degradados en ácidos grasos y glicerol, siguiendo una secuencia definida de pasos: primeramente, se produce la movilización de los depósitos adipocíticos por medio de la acción de lipasas para hidrólisis de los mismos, lo que resulta en la liberación de una molécula de glicerol y 3 ácidos grasos correspondientes (30, 31). Por un lado, el glicerol se convertirá gracias a una serie de enzimas en glucosa, principal fuente de energía en el organismo humano y la mayoría de los vertebrados, mientras que los ácidos grasos ejercen la mayoría de sus funciones como precursores de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, vitales para la respuesta inflamatoria y la regulación de la temperatura corporal; además, son esenciales para la formación de la estructura de las membranas celulares (29).

### **3.2.2. TEJIDO ADIPOSEO MULTILOCULAR**

Este tipo de tejido se encuentra en gran cantidad en el periodo neonatal. Pueden encontrarse algunos restos en los adultos en el espacio retroperitoneal, región cervical profunda y supraclavicular, regiones interescapulares, paravertebral y mediastino. Su principal función es la producción de calor (31). En este tipo de tejido los adipocitos son multiloculares, esferoidales, núcleo excéntrico redondeado, diámetro pequeño de 10 a 20  $\mu\text{m}$ , contiene abundantes mitocondrias bien diferenciadas, gran densidad de fibras nerviosas simpáticas y tejido muy vascularizado cuya lipogénesis aumenta con la exposición al frío. Este tejido disminuye hacia la vida adulta, siendo su función termogénica la de principal importancia durante el periodo neonatal (29).

### **3.2.3. DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL DEL TEJIDO ADIPOSEO**

El tejido adiposo no es detectado macroscópicamente durante la vida embrionaria. Comienza su desarrollo en el último trimestre de la gestación con pequeñas arteriolas

que pueden ser encontradas en la vecindad de pequeños cúmulos de células adiposas. Estos cúmulos no cambian antes del nacimiento (31). A partir del quinto mes de vida fetal, los cúmulos de células adiposas se denominan adipoblastos, que pronto se diferencian en pre-adipocitos que aún no son capaces de acumular triacilgliceroles. Posteriormente, se diferencian a adipocitos maduros, que predominan en la vida fetal, para posteriormente en la vida posnatal adquirir su propiedad final de adipocitos maduros, que no poseen capacidad para dividirse, pero sí de almacenar grandes cantidades de gotas lipídicas (31).

### **3.2.4. FACTORES ADIPOGÉNICOS Y ANTIADIPOGÉNICOS**

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) es el primer requerimiento hormonal para generar adipocitos a partir de adipoblastos (32). Zeelak y Green reportaron que el requerimiento de hormona de crecimiento (GH) es seguido de un incremento de respuesta a IGF-1 (33). Esta observación afirma que la aplicación exógena de IGF-1 es obligatoria y suficiente para la diferenciación de células 3T3-L1, células de estirpe adipocítica muy similares a los fibroblastos (34, 35). Se ha comprobado que la insulina, IGF-1 y sus receptores median la máxima expresión de la diferenciación terminal (33, 34). Por otro lado, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) han sido destinados como sustancias antiadipogénicas (35). En cuanto al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), se ha demostrado que inhibe la expresión de sustancias específicas de diferenciación de adipocitos, como la adiponecina (32). Estudios *in vivo* han demostrado el efecto positivo sobre la sensibilidad a la insulina por parte de los estrógenos y la disminución de la misma por los andrógenos (32, 33). Probablemente la correlación entre andrógenos y estrógenos sea un factor determinante en el tamaño adipocítico a través de vías de señalización por IGF-1, influyendo a su vez en el sobrepeso, obesidad, y resistencia al insulina (33).

### **3.3. INTERACCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO**

#### **3.3.1. GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO**

El sistema inmunológico es un conjunto de células y órganos que le permiten mantener la homeostasis o equilibrio interno frente a agresiones externas, ya sean de naturaleza biológica (agentes patógenos) o físico-química (como contaminantes o radiaciones), e internas (por ejemplo, células cancerosas) (36).

Este sistema es vital para el mantenimiento del organismo sano; sin embargo, es un arma de doble filo, ya que sistema inmune hiperactivo puede producir enfermedades, llegando a reconocer lo propio como extraño, con la consecuente defensa contra lo supuesto extraño lesionando tejidos vitales para la supervivencia y que en ocasiones pueden llegar a ser mortales (37). El sistema inmunitario normal tiene tres propiedades fundamentales: su repertorio es capaz de reconocer una gama muy amplia de microorganismos patógenos; memoria inmunitaria: para generar respuestas antes presentes de forma más rápida y eficiente y; tolerancia inmunitaria: para evitar lesiones a los tejidos propios (38).

#### **3.3.2. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA**

El sistema inmune se divide en dos ramas básicas: la inmunidad innata y la adaptativa.

La inmunidad innata se compone principalmente de barreras mecánicas y químicas que bloquean la entrada de microorganismos, células innatas (macrófagos, células dendríticas, células polimorfonucleares y linfocitos NK) y el sistema del complemento. Las dos reacciones básicas más importantes de la respuesta innata son la inflamación y la defensa contra microorganismos patógenos en general (37, 38).

La inmunidad adaptativa se encuentra conformada principalmente por linfocitos B y T y sus productos, como los anticuerpos y las citocinas. Se subdivide a su vez en

inmunidad humoral, mediada en mayor parte por linfocitos B, cuyas secreciones se componen mayoritariamente de anticuerpos que protegen frente a los microorganismos y sus toxinas; e inmunidad celular, mediada primariamente por linfocitos T, que son responsables de la protección en infecciones por microorganismos intracelulares y de la regulación general del sistema inmunológico (37).

Por otro lado, las citocinas son proteínas solubles producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, tanto innatas como adaptativas, que interaccionan con receptores celulares específicos que participan en la regulación de la supervivencia, crecimiento, diferenciación y activación de otras células. Algunas tienen propiedades pro-inflamatorias, como las interleucinas (IL) 1, 6, 12 y el TNF-alfa, mientras que otras tienen actividad anti-inflamatoria, como la IL-10 y TGF-beta (37). El TNF-alfa y la IL-6 resultan elevados en el suero de individuos obesos (38). Subsecuentemente, dichos factores inducen la activación de vías intracelulares que regulan negativamente la acción de la insulina en los adipocitos y hepatocitos. Células inmunes antiinflamatorias como macrófagos, células T reguladoras y eosinófilos, ejercen una función antiinflamatoria al secretar IL-10 y se encargan de mantener la sensibilidad a la insulina (39).

### **3.3.3. PAPEL DE LAS CÉLULAS INMUNITARIAS EN EL TEJIDO ADIPOSO**

#### **MACRÓFAGOS Y TEJIDO ADIPOSO**

Los macrófagos comprenden 10 a 15 % del estroma vascular (sistémico). Durante el proceso inflamatorio podemos encontrar dos tipos principales de macrófagos: los M1, con función es proinflamatoria y están encargados de la defensa contra organismos extraños, presentación de antígenos y secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1beta; y los M2, cuya función antiinflamatoria por medio de citocinas como la IL-10 y TGF-beta promueven la desaparición del evento agudo inflamatorio, conllevando a una pronta recuperación de la respuesta inicial. Se ha observado que, en individuos con

diabetes, tanto el interferón gamma (IFN-gamma) como algunos lipopolisacáridos polarizan la diferenciación de los macrófagos hacia la estirpe M1, mediando la secreción de citocinas pro-inflamatorias (40).

## **NEUTRÓFILOS Y TEJIDO ADIPOSO**

Los neutrófilos son rápidamente reclutados a tejidos infectados. Los pacientes obesos exhiben incrementos significativos de proteínas derivadas de neutrófilos, incluyendo mieloperoxidasa y calprotectina (41).

## **EOSINOFILOS Y TEJIDO ADIPOSO**

Se ha demostrado que el número total de eosinófilos se encuentra reducido en el tejido adiposo de obesos de forma inducida (DIO) y ratones *ob/ob*, en los que la producción de leptina se encuentra ausente de forma congénita (42).

## **CÉLULAS DENDRÍTICAS:**

Son un tipo de células especializadas cuya función principal es procesar material antigénico, devolverlo a su superficie y presentarlo a los linfocitos T para iniciar la respuesta celular y humoral (43). Estas células están incrementadas en tejido adiposo de individuos obesos (44).



## **LINFOCITOS Y TEJIDO ADIPOSO**

Se ha observado que el número total de células T se encuentra incrementado en la lesión crónica en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y sobrepeso como respuesta a factores específicos producidos por el tejido adiposo (45). Las células T reguladoras están relativamente aumentadas en tejido adiposo en comparación con vaso, pulmón y nódulos linfáticos (46). Recientemente se ha sugerido que los adipocitos podrían actuar como presentadores de antígenos a las células T, ya que también se ha reportado que los adipocitos expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (47, 48).

### **3.4. PROCESO INFLAMATORIO**

La inflamación es una reacción tisular compleja que consiste básicamente en la respuesta de los vasos sanguíneos, esencialmente microcapilares, y las funciones de los leucocitos. Las reacciones vascular y celular de la inflamación se activan mediante factores solubles producidos por diversas células o generados a partir de proteínas plasmáticas, que se activan o producen en respuesta al estímulo inflamatorio. La inflamación puede ser aguda o crónica en función de la naturaleza del estímulo y de la eficacia de la reacción inicial para eliminar el estímulo nocivo o los tejidos lesionados (37).

#### **3.4.1. INFLAMACIÓN AGUDA**

Es una respuesta rápida que sirve para hacer llegar leucocitos y proteínas plasmáticas al foco de infección o lesión tisular. Está constituida por tres componentes esenciales: 1) alteraciones del calibre vascular, que aumentan el flujo de sangre; 2) cambios

estructurales de los microvasos, que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos y; 3) migración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de los mismos en el foco de lesión y activación para eliminar el agente lesivo (49). La naturaleza del infiltrado leucocitario sufre modificaciones según la edad de la respuesta inflamatoria y el tipo de estímulo. En la mayor parte de las formas de inflamación aguda predominan los neutrófilos durante las primeras 6 a 24 horas y se sustituyen por monocitos entre 24 a 48 horas (50). Los monocitos una vez activados se convierten en macrófagos. Estos se dividen en dos subtipos según los diferentes estímulos que se producen. Los macrófagos M1 son activados por la vía clásica a través del aumento en la secreción de IFN-gamma por parte de los linfocitos T, en respuesta al estímulo por la inmunidad innata o adaptativa (38). Los macrófagos M1 producen especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico (ON), IL-1-beta, IL-12 e IL-23 (49). En cuanto a los macrófagos M2, se sabe que son activados por la vía alternativa del complemento y por otros leucocitos, como los linfocitos T reguladores y se encargan de una respuesta antiinflamatoria, a diferencia de los macrófagos tipo uno, secretando IL-10 y TGF-beta, un péptido promotor del proceso fibrótico de la matriz extracelular (38, 50).

### **3.4.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA**

La inflamación crónica tiene una duración prolongada de semanas o meses, y en este periodo coexisten la inflamación, las lesiones tisulares, y los intentos de reparación en combinaciones variables. La inflamación crónica se caracteriza por: Inflamación con células mononucleares, que incluyen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas; destrucción tisular inducida por el agente lesivo persistente o por las células inflamatorias; intentos de curación mediante sustitución por tejido conjuntivo de tejidos lesionados, que se consiguen mediante la proliferación de pequeños vasos y en concreto, mediante fibrosis (49). El macrófago es la célula predominante en la inflamación crónica. Cuando un monocito alcanza el tejido extravascular, se transforma en macrófago. Los productos de los macrófagos sirven para eliminar agentes lesivos, o

para iniciar el proceso de reparación, y son responsables en gran parte de las lesiones tisulares en la inflamación crónica (38).

En pacientes obesos y modelos animales de obesidad, la secreción de hormonas en los adipocitos se encuentra mal regulada. La obesidad está asociada con un estado crónico de inflamación de bajo grado en el tejido adiposo caracterizada por la infiltración de macrófagos, los cuales responden principalmente a los productos liberados directamente por los adipocitos, tales como TNF-alfa, ligandina 2 e IL-6 (39).

### **3.4.3. TNF-ALFA EN EL TEJIDO ADIPOSO DURANTE EL PROCESO INFLAMATORIO**

Estudios anteriores han investigado la respuesta del factor nuclear kappa B (NF-kB) mediado por estimulación con el TNF-alfa. Luego del tratamiento con TNF-alfa, se investigó la presencia de macrófagos y la actividad de NF-kB, encontrándose un incremento en ambos casos y así demostrando mayor actividad inflamatoria (48). Por otro lado, co-cultivando adipocitos y macrófagos se ha logrado demostrar respuesta *in vitro* después del estímulo con TNF-alfa; comprobando la existencia de mayor actividad de NF-kB. En otro estudio, células 3T3/NFKBrelucRF, células de linaje de ratón con morfología similar a los fibroblastos con tendencia a desarrollar adipocitos, fueron inoculadas en tejido adiposo blanco epididimario derecho. Diez días después del trasplante, 20 mg/Kg de LPS (lipopolisacárido) fueron administrados y mediante bioluminiscencia se demostró incremento en la producción de TNF-alfa en el tejido epididimario a las 2 horas, con un incremento máximo a las 4 y descenso a las 6 horas (39, 48).

#### **3.4.4. PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA DEL TEJIDO ADIPOSO**

Durante la expansión de la masa adiposa en la obesidad, la vascularización se vuelve insuficiente para mantener la normoxia (51). La hipoxia resulta en una expresión de adipocinas pro-inflamatorias. La sobreexpresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, el principal factor promotor para el desarrollo en nuevos vasos a nivel tisular) en ratones transgénicos termina en un crecimiento de varios vasos, resultando a su vez en protección contra la hipoxia. Los ratones transgénicos pueden presentar infiltración con macrófagos M2 antiinflamatorios, en comparación de macrófagos M1 de ratones de fenotipo silvestre (52, 53).

Se realizó un estudio con dos líneas de ratones transgénicos L1 Y L2 que expresaban aumento ligero y elevado de VEGF respectivamente, se observó que a las 15 semanas de tratamiento con una dieta alta en grasas, un menor tamaño adipocítico, menor temperatura corporal y menor acumulación de grasa en el hígado de los ratones transgénicos L1 y L2 en comparación con el control. Con esto se demuestra que el VEGF es un factor esencial para la disminución de la obesidad, demostrando a su vez el efecto de la hipoxia sobre la angiogénesis y su posible efecto contrarregulador como factor antiadipogénico provocado por el aumento de masa de tejido adiposo consecuencia de la dieta alta en carbohidratos y productos calóricos (52).

La inflamación en obesidad, en contraste a la respuesta inmune clásica a lesiones o infección, es modesta y sin aparente resolución con el tiempo. Se piensa que la inflamación en el hígado es secundaria a la inflamación en el tejido adiposo y de poca importancia en el desarrollo de la inflamación metabólica y resistencia a la insulina (39, 53).

### **3.5. PAPEL DE LA LIPOCALINA 2 EN EL PROCESO INFLAMATORIO CRONICO DEL TEJIDO ADIPOSO**

#### **3.5.1. ¿QUÉ ES LA LIPOCALINA 2?**

La lipocalina 2 (LCN2) es una adipocina de reciente descripción, con un rol potencial en la obesidad, resistencia a la insulina e inflamación (54). Ha sido previamente caracterizada como una citocina/adipocina que jugaría un rol en la homeostasis de glucosa y lípidos (55). Dicha proteína, asociada a la gelatinasa neutrofílica, es un componente del sistema inmune innato con un rol clave en la respuesta de fase aguda a la infección y la inducción de apoptosis (54). La expresión de lipocalina 2 puede ser inducida por TNF-alfa, en la estirpe adipocítica 3T3-L1, mientras que sus niveles circulantes se encuentran reducidos en respuesta a receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) (56).

#### **3.5.2. ANÁLISIS DE LOS GENES Y MOLÉCULAS DE LIPOCALINA**

Los niveles expresivos de genes y proteínas de LCN2 (lipocalina-2) en tejido adiposo visceral se encuentran elevados en la obesidad humana. Un análisis por PCR en tiempo real indicó que los niveles de expresión de ARN mensajero en tejido adiposo blanco fueron significativamente más altos en ratones obesos comparados con un grupo control (57). La presencia de LCN2 en secciones de tejido adiposo blanco ha sido confirmada por análisis inmunohistoquímico. Las células adiposas y las de la fracción estromovascular se consideran inmunopositivas para LCN2, detectándose diferencias no significativas en los niveles circulantes de LCN2 entre individuos obesos y normales. Sin embargo, se observa un incremento de las concentraciones circulantes del complejo LCN2/MMP-9 en individuos obesos (58). Las concentraciones del complejo se correlacionan positivamente con el IMC, leptina, marcadores inflamatorios y fibrinógeno. Asimismo, para dirigir la relevancia de la inflamación, los niveles de expresión de

metaloproteinasa 2 y metaloproteinasa 9 (MMP-2, MMP-9), enzimas cuya función consiste en la digestión de la matriz extracelular para el remodelado de los tejidos, y TNF-alfa han sido demostrados en tejido blanco adiposo en sujetos obesos, comparado con sujetos controles (59). Dado que los macrófagos son una importante célula productora de citocinas proinflamatorias, el marcador CD68 específico de macrófagos, ha podido ser utilizado para evaluar el impacto de los macrófagos residentes en el tejido adiposo, encontrándose a su vez niveles elevados de CD68, MMP-9 y de TNF-alfa en sujetos obesos (60).

En otro estudio, se investigó el rol de la lipocalina 2 en el remodelado de tejido adiposo durante el tratamiento con HFD en la inducción de la obesidad. La expresión PPAR-gamma fue regulada a la baja, mientras que la expresión de proteínas de matriz extracelular fue regulada a la alta en tejido adiposo de epidídimo de ratones deficientes de lipocalina 2 (61).

### **3.5.3. ROL DE LA LIPOCALINA EN LA REGULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN**

Algunos datos muestran que LCN2 es capaz de inducir la expresión de PPAR en ausencia de insulina en adipocitos, a su vez se ha confirmado el bajo efecto de la LCN2 sobre la acción de la insulina (62). Esto sugiere que la función antiinflamatoria de LCN2 está asociada con su modulación de la actividad del PPAR mediante mecanismos directos o indirectos probablemente a través de la estimulación NF-kB (63).

Otros resultados muestran claramente que LCN2 atenúa el efecto de TNF-alfa sobre la absorción de glucosa, así como la expresión proteica de PPAR, GLUT4 e IRS-1 (62). Este hallazgo sugiere fuertemente que la anti-inflamación es el papel principal de LCN2 en el tejido adiposo, y la regulación de la expresión de genes metabólicos en los adipocitos es probable que el efecto secundario de LCN2. Para caracterizar adicionalmente las propiedades anti-inflamatorias de LCN2 y su posible papel como adipocina auto- o paracrina en la regulación de la inflamación y su metabolismo

relacionado, se examinó y comparó el impacto de LCN2 sobre las respuestas inflamatorias de adipocitos y macrófagos a TNF-alfa y su estimulación por medio de LPS. El efecto de LCN2 sobre la sensibilidad a la insulina en adipocitos no es significativo, pero LCN2 afecta marcadamente la secreción adipocitaria de leptina y adiponectina, dos reguladores metabólicos sistémicos claves (63). Dadas estas conclusiones, la probabilidad de que la LCN2 afecte la sensibilidad a la insulina a través de la regulación de la función secretora de los adipocitos se encuentra marcadamente aumentada. Dado el papel anti-inflamatorio de LCN2, así como el aumento de LCN2 en la obesidad y en la resistencia a la insulina, podría considerarse a la LCN2 como un mecanismo protector contra la sobre activación de la inflamación. Esta hipótesis es apoyada por datos que señalan que el pico de TNF-alfa precede al pico de LCN2 *in vitro* luego de la estimulación metabólica en los adipocitos, no obstante los ligandos y receptores de LCN2 no han sido bien determinados y los ligandos potenciales incluyen péptidos formales, como el oleato de colesterol y el ácido retinoico (64).

La principal limitación para comprobar los efectos de la lipocalina como reacción al efecto inflamatorio en términos generales reside en la falta de datos que permitan conocer los mecanismos que subyacen al aumento de las concentraciones séricas de LCN2 en la obesidad y sus patologías relacionadas, de tal forma que no ha sido posible abordar la cuestión de si el aumento de la LCN2 es un factor causal o simplemente un espectador irrelevante en la patogénesis de las anomalías metabólicas asociadas con la obesidad. Otros estudios longitudinales deberían permitir determinar la dirección de las asociaciones observadas, los factores reguladores que modulan la lipocalina sérica 2 y el valor predictivo de este biomarcador para las enfermedades metabólicas y cardiovasculares asociadas con la obesidad (65).

### **3.5.4. RELACIÓN DE LA LIPOCALINA 2 CON EL TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y VISCERAL**

El tejido adiposo subcutáneo tiene una alta capacidad de hiperplasia, pero se encuentra menos inflamado en respuesta al tratamiento con HFD que el tejido adiposo visceral. Numerosos estudios indican que un riesgo elevado de resistencia a la insulina y síndrome metabólico está cercanamente asociado a un incremento en tejido adiposo visceral, pero no a tejido adiposo subcutáneo (61). Los ratones alimentados con HFD y deficientes a lipocalina 2 son más sensibles al frío y desarrollan un significativo incremento en la masa corporal que exacerba la dislipidemia, hígado graso y resistencia a la insulina (59). Se ha demostrado que el tratamiento con tiazolidinediona un agonista de PPAR-gamma actúa como promotor de resistencia a la insulina en ratones deficientes de lipocalina 2. En ausencia de lipocalina 2, la hipertrofia adipocítica inducida por la edad y HFD se encuentra marcadamente exacerbada. Se ha demostrado también que la lipocalina 2 se encuentra en concentraciones altas en tejido inguinal adiposo, esto sugiere que puede tener efectos locales en el remodelado y metabolismo (61). En un estudio longitudinal en donde se utilizaron ratones deficientes de lipocalina 2 y controles alimentados con HFD y alimentación normal a las 15 y 30 semanas en los que se tomó tejido inguinal adiposo y epididimario, se demostró que hubo un incremento significativo en la masa adiposa en las zonas inguinales y epididimarias del grupo sin tratamiento y en la zona inguinal del grupo con HFD siempre mayor en el grupo deficiente de lipocalina 2, no obstante se observó una disminución de la masa adiposa en la zona epididimaria en el grupo deficiente de lipocalina tratada con HFD, sugiriendo diferente rol de la lipocalina en diferentes áreas de depósito de grasa. La expansión del tejido adiposo subcutáneo ha sido considerado como beneficioso para la prevención y reducción del depósito de grasa de forma ectópica (60, 61).



#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hablar de obesidad significa hablar de un proceso largo de tipo multifactorial, relacionado con mecanismos de inflamación crónica, la cual se caracteriza por acumulación excesiva de grasa en el cuerpo que se incrementa hasta un punto en que pone en riesgo la salud o la vida, en la que influyen enormemente el estilo de vida y la dieta. Se ha convertido en una patología muy común hoy en día, que a su vez ha llevado a la sociedad mundial a la necesidad de mejorar los recursos para su detección temprana y prevención. La obesidad es una enfermedad crónica prevenible en la mayoría de las ocasiones dado su origen multifactorial. Se sabe que la obesidad y el sobrepeso son la quinta entidad como factor de riesgo de defunción alrededor del mundo. Cada año fallecen por lo menos 2.8 millones de personas adultas como consecuencia de esta patología (66).

Se conoce que en pacientes obesos y modelos animales de obesidad, la secreción de hormonas en los adipocitos se encuentra mal regulada. La obesidad está asociada con un estado crónico de inflamación de bajo grado en el tejido adiposo, caracterizada por la infiltración de macrófagos, los cuales responden principalmente a los productos liberados directamente por los adipocitos tales como citocinas y la lipocalina 2 (65). Según algunos estudios y las caracterizaciones de la LCN2 se ha demostrado que sus efectos son capaces de atenuar el efecto de TNF-alfa sobre la absorción de glucosa, así como la expresión proteica de PPAR, GLUT4 e IRS-1, sugiriendo el probable efecto contrarregulador de los eventos proinflamatorios en diversos tejidos, resaltando el papel principal de su expresión en tejido adiposo de individuos obesos (62).

El uso de edulcorantes por parte de la población mundial se ha diseminado ampliamente en un intento de mejorar el panorama actual del problema de obesidad. No obstante, las estadísticas en México y en el mundo indican que la incidencia de obesidad y sus consecuencias patológicas se han incrementado aún con el uso indiscriminado de edulcorantes comerciales (30).

La principal causa que ha llevado al uso indiscriminado de edulcorantes se ilustra por el esfuerzo de disminuir los efectos de uso azúcares en el metabolismo de personas obesas y la prevención de la aparición de resistencia a la insulina, sin embargo, se ha comprobado y por medio de diversos estudios analizado el efecto de los edulcorantes como promotor del proceso inflamatorio crónico del tejido adiposo y que, a su vez, induce obesidad y resistencia a la insulina (67).

De seguir este efecto en aumento, se podría hablar de una consolidación por parte de la resistencia a la insulina, diabetes mellitus y sus complicaciones microangiopáticas y cardiovasculares como la primera causa inamovible de morbilidad y mortalidad alrededor de la sociedad contemporánea (68).

#### **4.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué influencia tendrá el uso de edulcorantes comerciales naturales y artificiales en relación al tamaño y número de adipocitos, infiltración leucocitaria y expresión de lipocalina 2 en el tejido adiposo en un modelo murino?

## 5. JUSTIFICACIÓN

Conociendo la enorme influencia de marcas registradas que utilizan edulcorantes comerciales y la difusión como promotor de salud a nivel mundial de dichos compuestos, se busca establecer el impacto de algunos edulcorantes, entre ellos sucralosa, glucósidos de esteviol y sacarosa, en procesos inflamatorios crónicos, buscando marcadores indirectos tales como proteínas implicadas en respuesta a lesión tisular, infiltración y movilización leucocitaria en el tejido adiposo, resaltando el papel propio de la lipocalina 2, y con ello deducir la influencia en la obesidad y su consecuente resistencia a la insulina.

La obesidad se ha convertido en un problema real dentro de nuestra sociedad. Asimismo, el uso indiscriminado de edulcorantes comerciales se ha extendido en la población a lo largo de las últimas décadas, lo que conlleva el consumo crónico de dietas ricas en sustancias que pueden tener efectos metabólicos desconocidos aún (65).

De acuerdo con un informe de la OMS. Los impuestos a las bebidas azucaradas ayudan a reducir el consumo de estos productos y también la prevalencia de la obesidad y la diabetes tipo 2. El menor consumo de bebidas azucaradas implica una reducción en la ingesta de azúcares libres y de la ingesta calórica total, una mejor nutrición y una disminución del número de personas con sobrepeso y obesidad. La OMS recomienda que, si se ingieren azúcares libres, aporten menos del 10% de las necesidades energéticas totales; además, se pueden observar mejoras en la salud si se reducen a menos del 5%, Esto equivale a menos de un vaso de 250ml de bebida azucarada al día (13).

En 2013 la Asamblea Mundial de la Salud acordó metas mundiales de aplicación voluntaria para el control y prevención de enfermedades no transmisibles, entre ellas, diabetes y obesidad. A pesar de que la obesidad afecta a una gran proporción de la población mundial, las estimaciones de su incidencia y prevalencia no están disponibles para todos los países. En los Estados Unidos, la encuesta nacional de Salud y Nutrición

en los últimos 50 años ha proporcionado datos del seguimiento continuo de la prevalencia y la incidencia entre los adultos. En 2007-2008 la obesidad alcanzó una prevalencia ajustada por edad de 33,8% en total; 32,2% y 35,5% para hombres y mujeres respectivamente. En los niños y adolescentes la obesidad alcanza una prevalencia de 9.5% entre los 0 y 2 años, y 16.9% de los 2 a los 19 años. El aumento de la prevalencia en los últimos 30 años sugiere que los cambios en el estilo de vida y el aumento de alimentos hipercalóricos podrían contribuir al aumento de la obesidad. Actualmente el papel de la sacarosa ha suscitado bastante interés. A diferencia de las grasas para la que se ha demostrado la correlación entre el consumo y el aumento de peso; la relación entre el consumo de azúcares y el incremento de peso no es tan evidente (12, 13).

Un concepto novedoso, las respuestas aprendidas en cuanto a nutrición se refiere, nos indica que al alimentar a un individuo en principio con alimentos sin edulcorantes no nutritivos se crea una respuesta aprendida postprandial lo que incrementa niveles de insulina sérica, la restauración de depósitos grasos, proteicos y de carbohidratos. Esto sugiere que al realizar un cambio dietético a la ingestión de alimentos sin carga postprandial, propios de los edulcorantes no nutritivos, se puede generar una alteración en las respuestas aprendidas, con la movilización y depósito crónico de ácidos grasos, incremento en la producción de radicales libres, y con ello lesión de bajo grado crónica a órganos encargados propiamente del almacén de nutrimentos, en específico, tejido adiposo. Esto sumado a una dieta alta en grasas que se consume en nuestros días, es posible deducir que la combinación de alteración en las respuestas aprendidas y la sobrecarga alternante o mixta de un alto aporte calórico, puede potenciar los efectos adversos en el tejido adiposo (68).

El estudio en modelo murino del efecto de los edulcorantes en el proceso inflamatorio crónico del tejido adiposo puede dar una idea general sobre la fisiopatología y las consecuencias propias del uso indiscriminado de estos y a su vez, puede refutar o reafirmar la idea sobre la no utilidad y riesgo de el uso indiscriminado de los mismos (69).

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los cambios en número y tamaño de adipocitos, infiltración leucocitaria y expresión de lipocalina 2 en el tejido adiposo en un modelo murino de suplementación crónica de edulcorantes comerciales.

### **6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar en el modelo experimental, por tipo de edulcorantes y sexo de los ratones:

- A) Impacto de la utilización de edulcorantes en el número y tamaño de los adipocitos en tejido adiposo gonadal y mesentérico.
- B) Visualización y conteo relativo de leucocitos infiltrados en tejido adiposo gonadal y mesentérico.
- C) Efecto de la utilización de edulcorantes en la expresión de la proteína lipocalina-2 a través de cuantificación de intensidad media de fluorescencia para esta proteína en tejido adiposo gonadal y mesentérico.

## 7. HIPÓTESIS

**Hipótesis alterna:** El uso persistente de edulcorantes artificiales y naturales promueve el aumento en el número y tamaño de adipocitos, una mayor infiltración leucocitaria y mayor expresión de la proteína lipocalina 2 en el tejido adiposo de un modelo murino de la cepa BALB/c.

**Hipótesis nula:** El uso persistente de edulcorantes artificiales y naturales no promueve el aumento en el número y tamaño de adipocitos, una mayor infiltración leucocitaria y mayor expresión de la proteína lipocalina 2 en el tejido adiposo de un modelo murino de la cepa BALB/c.

## **8. MÉTODO**

### **8.1. DISEÑO DE ESTUDIO**

Tipo de investigación: Observacional y experimental.

Tipo de estudio: Prospectivo, comparativo y transversal.

### **8.2. UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA**

Se empleó como modelo experimental ratones de la cepa BALB/c, los cuales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio: ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, con temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), comida y agua *ad libitum*. Todos los estudios se realizaron bajo los principios y procedimientos descritos por los Institutos Nacionales de Salud y de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

### **8.3. MODELO EXPERIMENTAL**

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es un roedor que se utiliza para la investigación científica. Su cariotipo está integrado por 40 cromosomas. Para cada experimento se escogen ratones de laboratorio que pertenezcan a una misma cepa pura (singénica) o endogámica. Los individuos de una misma cepa poseen genes idénticos, lo cual permite la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos experimentales sin que se produzca confusión debido a las diferencias genéticas. Una de las cepas más utilizada es la BALB/c (70).

### **8.3.1. CEPA BALB/c**

Es una cepa albina, del ratón doméstico, del que se derivan una serie de generaciones comunes (actualmente más de 200 generaciones). La vida promedio de los ratones de esta cepa es 575 días. La relación del peso de su cerebro y el resto del cuerpo es de 1/18 (71). Son una especie endogámica con expresión disminuida de linfocitos T CD4<sup>+</sup>; los ratones BALB/c tienen las características de crianza fácil y mínimas variaciones de peso entre hembras y machos. Son más sensibles a carcinógenos respecto al resto de las cepas de ratones (72).

### **8.3.2. CONDICIONES DE CRIANZA**

Los ratones BALB/c necesitan una infraestructura adecuada para su manejo y producción así como también someterse a un programa de controles microbiológicos periódicos. Deben mantenerse en ambientes bajo un sistema de barreras sanitarias absolutas (73). El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. Las condiciones ambientales requeridas se logran mediante un buen diseño del sistema de ventilación y pasteurización; del control de la temperatura y la humedad relativa; siendo parámetros macro y microambientales de extrema importancia. Las áreas destinadas para el lavado, procesamiento y esterilización de los insumos deben funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior. Esta cepa requiere alimento y agua de bebida purificados, temperatura ambiente en torno a 24°C, humedad relativa alrededor de 55%, una ventilación entre 10 y 15 recambios por hora, un fotoperiodo uniforme luz/oscuridad de 12/12 horas y bajos niveles de ruido (por debajo de 85 decibeles) (74).

El manejo reproductivo de estas colonias se realiza mediante el empleo del sistema de consanguinidad, para mantenimiento del carácter endogámico de la cepa (75).



### 8.3.3. DATOS BIOLÓGICOS DE LA CEPA

**Tabla 2: Características generales del modelo BALB/c (76).**

Peso del macho adulto	25-40 g
Peso de la hembra adulta	20-35 g
Peso al nacer	1-2 g
Peso al destete	11-12 g
Promedio medio de vida	2-3 años
Edad para el apareo	8-9 semanas
Ciclo astral	4-5 días
Duración del estro	6-11 horas
Vida reproductiva	8-12 meses
Gestación	19-22 días
Destete	19-21 días
Tamaño de camada promedio	1-4 crías
Consumo de agua	8-10 mL/ratón/día
Consumo de alimento	3-6 g/ratón/día

### 8.4. ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS EXPERIMENTALES Y OBTENCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO PARA SU ANÁLISIS POR MICROSCOPIA

Se utilizaron como base 24 ratones de la cepa BALB/c, incluyendo 12 machos y 12 hembras, alimentados con alimento para roedor y suplementados con los edulcorantes necesarios. 21 días posteriores al parto, se destetaron las crías y a las 8 semanas se dividieron en los siguientes grupos, según el tipo de edulcorante:

- Grupo 1.- Glucósidos de esteviol: 6 ratones, 3 hembras y 3 machos, tratados con glucósidos de esteviol en presentación comercial en cantidad de 1 g (equivalente

a 10 g o dos cucharadas de té de sacarosa y conteniendo 0.025 g de glucósidos de esteviol) diluido en 100 mL de H<sub>2</sub>O, por día, vía oral, durante 6 semanas.

- Grupo 2.- Sucralosa: 6 ratones, 3 hembras y 3 machos, tratados con sucralosa en presentación comercial en cantidad de 1 g (equivalente a 10 g o dos cucharadas de té de sacarosa y conteniendo 0.12 g de sucralosa) diluido en 100 mL de H<sub>2</sub>O, por día, vía oral, durante 6 semanas.
- Grupo 3.- Sacarosa: 6 ratones, 3 hembras y 3 machos, tratados con sacarosa en cantidad de 10 g (dos cucharadas de té) diluidos en 100 mL de H<sub>2</sub>O, por día, vía oral, durante 6 semanas.
- Grupo 4.- Control: 6 ratones, 3 hembras y 3 machos, sin edulcorantes y sólo con consumo de agua a libre demanda.

El edulcorante específico del grupo fue suministrado durante 6 semanas en su agua diaria. A las 14 semanas de vida, los animales se sacrificaron y se tomaron muestras del tejido adiposo mesentérico y gonadal de cada uno.

### **8.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Ratones BALB/c adultos de 8 semanas de vida, machos y hembras, con un peso entre 18 y 25 g.

### **8.6. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Ratones de la cepa BALB/c que enfermaron o murieron durante el estudio.

## 8.7. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO

Se obtuvieron animales previamente criados en condiciones de bioterio de la cepa BALB/c, de cada uno de los grupos experimentales, según la fecha de cumplimiento del tiempo establecido de 6 semanas de tratamiento. Los ratones fueron llevados al laboratorio, donde se preparó el material para la obtención de las muestras. El material para la extracción de muestras se utilizó en condiciones de esterilidad, además de incluir instrumentos de acero inoxidable que se conforman de pinzas de disección con y sin dientes, pinzas Kelly rectas, tijeras mayo, sujetadores y una superficie de hule espuma para colocar a los individuos anestesiados; se incluyeron recipientes para la recolección de muestras, para formaldehído al 4% con zinc al 0.5% para la preservación de las muestras y una solución tampón salino de fosfatos isotónico pH. 7.4 (*phosphate-buffered saline*, PBS) y para perfusión de tejidos.

Se procedió con la anestesia del animal. Para esto se utilizó pentobartibal sódico 2.5 UI o 25  $\mu$ L por cada 25 gramos de peso, y se esperó hasta lograr el efecto deseado de sedación del ratón (anestesia completa). Posteriormente, se tomó el ratón y se colocó en decúbito supino en la superficie de hule espuma y se fijaron los 4 miembros a la mesa, por medio de fijadores. Posteriormente, se realizó la disección, comenzando por cortar la piel por la línea media sagital, desde la zona inguinal hasta la parte superior del tórax; enseguida, se disecó la fascia y los músculos por la misma línea y se cortó la caja torácica para exponer el corazón; se cortó la vena cava para la posterior perfusión completa con PBS, se perfundió con 20 mL de PBS directamente en el ventrículo izquierdo (para sacar la sangre del ratón de circulación y órganos). Una vez perfundido completamente, se procedió a la toma de muestras: una muestra del tejido adiposo visceral, que incluyó mesenterio y epiplones y una segunda muestra recolectada de tejido adiposo perigonadal, obteniendo usualmente mayor cantidad de este en la hembra que en el macho. Las muestras fueron colocadas en recipientes con paraformaldehído al 4% y zinc al 0.5% para su conservación, se rotularon y refrigeraron a 4°C hasta su uso.

El cadáver fue colocado en un contenedor con residuos biológicos no infecciosos, y enviado a congelación para su posterior recolección por la empresa contratada por la Facultad de Medicina para este fin.

### **8.8. FIJACIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA**

Con muestras de tejido adiposo previamente refrigeradas en paraformaldehído al 4% y zinc al 0.5%, se procedió a realizar la fijación. Con PBS se removieron las impurezas de la muestra. Se continuo con la deshidratación del tejido, por lo que para esto se sumergió el mismo cada diez minutos en etanol y xileno a diferentes concentraciones, siguiendo el siguiente orden: etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%, etanol al 100%, etanol al 100%, etanol al 100%, 2:1 etanol 100%-xileno, 1:1 etanol 100-xileno, 1:2 etanol 100%-xileno, xileno 100%, xileno al 100%, xileno al 100%.

Para la fijación en parafina, esta fue derretida a 60° C en baño maría y rebajada con xileno para obtener las siguientes concentraciones: 2:1 Xileno-parafina, 1:1 xileno-parafina, 1:2 xileno-parafina. Inmediatamente después de extraer la muestra de tejido del xileno al 100%, se colocó en cada solución de xileno-parafina por media hora en orden decreciente respecto a la concentración del xileno, excepto en la última concentración, en la que la muestra permaneció por 24 horas en incubación a 58°C. Después de 24 horas de incubación, el tejido se extrajo de la solución y se colocó en parafina al 100% previo a los cortes.

### **8.9. CORTES EN PARAFINA**

Una vez obtenidos los bloques de parafina, se procedió a realizar los cortes. El material para la realización de estos incluye un micrótopo para cortes delgados y portaobjetos. Se colocó el bloque de parafina en el soporte del micrótopo previamente calibrado para

realizar cortes de 5 µm de grosor. Se obtuvieron varios cortes del bloque de parafina y estos fueron colocados en los portaobjetos dentro de un recipiente con agua corriente. Se dejaron secar los portaobjetos con la muestra para posteriormente destinar la mitad para la tinción con hematoxilina y eosina para el análisis de tamaño y número de adipocitos así como para determinar la infiltración leucocitaria (análisis por microscopia óptica de campo claro) y la otra mitad para el análisis de la expresión de la proteína de lipocalina-2 (análisis por inmunofluorescencia).

### **8.10. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA**

Para la tinción de los cortes con hematoxilina y eosina se siguió el siguiente proceso:

- Colocación de la muestra en xilol absoluto por 10 minutos.
- Colocación en xilol absoluto por 10 minutos
- Colocación en alcohol xileno 50/50 por 10 minutos.
- Colocación en alcohol al 96% por 10 minutos.
- Colocación en alcohol al 80% por 10 minutos.
- Lavado con agua corriente para retirar los residuos de alcohol.
- Hematoxilina por 3 minutos.
- Lavado con agua corriente nuevamente.
- Eosina por 3 minutos.
- 10 lavados en alcohol al 80%.
- 10 lavados en alcohol al 96%.
- 10 lavados en alcohol absoluto.
- 10 lavados en alcohol xilol 50/50.
- 10 lavados en xilol absoluto.
- 10 lavados en alcohol absoluto.

Para el análisis cuantitativo de las secciones, se tomó como premisa el tamaño del adipocito del tejido adiposo blando, que es de 15 a 150  $\mu\text{m}$ , Visualizando en microscopio óptico (Leica ICC50 E) a una magnificación de 40X, se tomaron las medidas correspondientes de los grupos tratados con edulcorantes y el grupo control, para obtener resultados tomando en cuenta el rango de tamaño de los adipocitos, siendo la medida de referencia de 1 a 150  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis del número relativo leucocitario respecto al control, se tomaron fotografías de las muestras y apoyándonos del programa ImageJ, se realizó el conteo aproximado de leucocitos por campo con magnificación 40X.

### **8.11. TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Se realizaron secciones de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de los bloques de parafina obtenidos de nuestras muestras. Se utilizó el método de desparafinización con parrilla histológica para derretir parafina y con soluciones decrecientes de alcohol y xileno para desparafinización de los residuos. Para la inmunorreacción, el tejido se preincubó en una solución de xileno absoluto durante 10 min, para eliminar impurezas.

Se realizaron dos lavados de 10 minutos en PBS y se realizó el bloqueo de los cortes durante 60 min con albúmina bovina al 1% (BSA), a fin de reducir el marcaje inespecífico. Se Incubó durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario contra lipocalina 2 (obtenido de conejo) diluido en BSA a una concentración de 1:50. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados de las secciones con PBS durante 10 min.

Inmediatamente después, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo-Alexa Fluor 647) a una dilución de 1:100, se realizó nuevamente un lavado para después colocar el medio de montaje (Vectashield) con DAPI (marcador de ácidos nucleicos). Las laminillas se analizaron por microscopía de fluorescencia, utilizando un

microscopio de inmunofluorescencia Nikon Eclipse Ti, para posteriormente cuantificar con el software NIS-ELEMENTS por medio de histogramas la intensidad media de fluorescencia (IMF) y hacer la comparación entre los diferentes grupos de tratamiento.

## 8.12. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>UNIDAD DE MEDIDA</b>
Consumo de edulcorantes naturales y artificiales	Cantidad de edulcorante comercial consumida en el agua de diario (glucósidos de esteviol, sucralosa y sacarosa)	Cantidad de solución de edulcorante consumida por el ratón (1 g de glucósidos de esteviol ó 1 g de sucralosa en presentación comercial equivalente a 10 g o dos cucharadas de té de sacarosa y conteniendo 0.025 g de glucósidos de esteviol ó 0.12 g de sucralosa) y sacarosa (10 g equivalente a dos cucharadas de té)	Cuantitativa continua	mL/día
Tamaño de los adipocitos	Medida de los adipocitos presentes en el tejido adiposo	Determinación del diámetro de los adipocitos en cortes de tejido adiposo gonadal y	Cuantitativa continúa	µm

	mesentérico y gonadal	mesentérico teñidos con hematoxilina y eosina y observados por microscopía óptica de campo claro		
No. de adipocitos	Número de adipocitos observados en tejido gonadal y mesentérico	Conteo de células con morfología específica de adipocitos en cortes de tejido adiposo gonadal y mesentérico teñidos con hematoxilina y eosina y observados por microscopía óptica	Cuantitativa discreta	No. adipocitos
Infiltración leucocitaria	Presencia de leucocitos en tejido adiposo gonadal y mesentérico	Conteo de células con morfología leucocítica en cortes de tejido gonadal y mesentérico teñidos con hematoxilina y eosina y observados por microscopía óptica de campo claro	Cuantitativa discreta	No. leucocitos
Expresión de Lipocalina-2	Cuantificación de la expresión de la proteína lipocalina 2 en tejido adiposo gonadal y mesentérico	Determinación de IMF de lipocalina 2 en cortes de tejido adiposo gonadal y mesentérico y observados por microscopía de fluorescencia	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias de IMF



## 9. RESULTADOS

### TAMAÑO CELULAR Y NÚMERO DE ADIPOCITOS.

Para determinar las características morfológicas de los adipocitos y determinar sus números relativos, nuestro estudio implementó microscopia óptica con microscopio de campo claro para visualización y toma de fotografías de campos con magnificación 40X en cortes de tejido adiposo gonadal y mesentérico con tinción de hematoxilina y eosina de machos y hembras tratados con edulcorantes nutritivos y no nutritivos. Nuestros resultados muestran que hay una variación en el promedio de tamaño de los adipocitos de los individuos de nuestros grupos, como se describe a continuación. Los datos son presentados en media con desviación estándar (D.E) de cuatro campos por individuo/grupo/sexo.

Se encontró una media de tamaño celular adipocítico de  $49.9 \pm 2.8 \mu\text{m}$  en los cortes de tejido gonadal de hembras del grupo control, alrededor de  $74.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$  en hembras tratadas con sacarosa ( $24.9 \mu\text{m}$  mayor al grupo control), de  $74.7 \pm 13.9 \mu\text{m}$  en hembras tratadas con glucósidos de esteviol ( $24.8 \mu\text{m}$  mayor al grupo control) y de  $36.3 \pm 4 \mu\text{m}$  en hembras tratadas con sucralosa ( $13.6 \mu\text{m}$  menor al grupo control) (**Figura 1A y B**). Adicionalmente en los grupos de machos se encontró una media de tamaño celular adipocítico de  $58.6 \pm 13 \mu\text{m}$  en los cortes de tejido gonadal del grupo control, de  $82.8 \pm 10.4 \mu\text{m}$  en el grupo tratado con sacarosa ( $24.2 \mu\text{m}$  mayor al grupo control), de  $70.9 \pm 14.6 \mu\text{m}$  en machos tratados con glucósidos de esteviol ( $12.3 \mu\text{m}$  mayor al grupo control), finalmente los individuos tratados con sacarosa presentaron un diámetro de  $51.7 \pm 9.7 \mu\text{m}$  ( $6.9 \mu\text{m}$  menor al grupo control) (**Figura 1 C y D**).

En cuanto al tejido adiposo mesentérico de hembras (**Figura 2A y B**), se encontró una media de tamaño celular adipocítico de  $49.1 \pm 2.5 \mu\text{m}$  en el grupo control, mientras que se observó un tamaño de  $62.6 \pm 11.2 \mu\text{m}$  en hembras tratadas con sacarosa ( $13.5 \mu\text{m}$  mayor al grupo control); por otro lado, se observó un tamaño promedio de  $66.5 \pm 4.6 \mu\text{m}$  en hembras tratadas con glucósidos de esteviol ( $17.4 \mu\text{m}$  mayor al grupo control) y de

53.8  $\pm$  10.4  $\mu$ m en hembras tratadas con sucralosa (4.7  $\mu$ m mayor al grupo control). En los machos, se observó una media de tamaño celular adipocítico de 79.2  $\pm$  5  $\mu$ m en los cortes de tejido mesentérico del grupo control, para los grupos suplementados se cuantificó una media de tamaño de 42.8  $\pm$  4.1  $\mu$ m en machos tratados sacarosa (36.4  $\mu$ m menor al grupo control), mientras que se encontró un tamaño de 61.8  $\pm$  18.3  $\mu$ m en machos tratados con glucósidos de esteviol (17.4  $\mu$ m menor al grupo control) y de 78.8  $\pm$  3.3  $\mu$ m en machos tratados con sucralosa (0.4  $\mu$ m menor al grupo control) **(Figura D y E)**.

Respecto al número de adipocitos de tejido adiposo gonadal de hembras **(Figura 1A y C)**, se encontró una media del número total de 153.9  $\pm$  8.1 adipocitos del grupo control, de 77.2  $\pm$  6.7 adipocitos por campo en hembras tratadas sacarosa (76.7 adipocitos menos que el grupo control); 77.2  $\pm$  22.7 adipocitos por campo en hembras tratadas con glucósidos de esteviol (76.7 adipocitos por campo menos que el grupo control) y de 176.5  $\pm$  6.1 adipocitos por campo en hembras tratadas con sucralosa (22.6 adipocitos más que el grupo control). En machos **(Figura 2D y F)** se reportó una media del número total de 133.2  $\pm$  34.2 adipocitos por campo en el grupo control, de 81.5  $\pm$  22.1 adipocitos por campo de los tratados con sacarosa (51.7 adipocitos por campo menos que el grupo control), 106.2  $\pm$  41.7 adipocitos por campo en machos tratados con glucósidos de esteviol (27 adipocitos menos que el grupo control) y 168.4  $\pm$  15.7 adipocitos por campo en machos tratados con sucralosa (35.2 adipocitos más que el grupo control).

En cuanto al número total de adipocitos en tejido mesentérico de hembras, logró cuantificarse una media del número total de 159.3  $\pm$  9 adipocitos por campo del grupo control, de 103.2  $\pm$  30.8 adipocitos por campo en hembras tratadas sacarosa (56.1 adipocitos menos que el grupo control), en hembras tratadas con glucósidos de esteviol pudieron observarse cifras menores con un número promedio de 85  $\pm$  8.5 adipocitos por campo (74.3 adipocitos menos que el grupo control) y de 120.7  $\pm$  30 adipocitos por campo en hembras tratadas con sucralosa (38.6 adipocitos menos que el grupo control) **(Figura 2A y C)**. Se observó una media número total de adipocitos de 82.9  $\pm$  8.4 por campo en los cortes de tejido mesentérico de macho del grupo control, de 104  $\pm$  15.7

adipocitos por campo en machos tratados sacarosa (36.4 adipocitos mas que el grupo control), de  $105.1 \pm 35.7$  adipocitos por campo en machos tratados con glucósidos de esteviol (22.2 adipocitos más que el grupo control) y de  $59.7 \pm 1.7$  adipocitos por campo en machos tratados con sucralosa (23.2 adipocitos menos que el grupo control) (**Figura 2B y D**).

## NÚMERO RELATIVO DE LEUCOCITOS INFILTRADOS EN TEJIDO ADIPOSO

Fue también de nuestro interés, analizar el número relativo (basado en contar el número de leucocitos revelados por la tinción de hematoxilina y eosina) de leucocitos infiltrados en el tejido adiposo de los ratones con el fin de determinar la respuesta celular a la probable lesión crónica del proceso inflamatorio en el tejido adiposo. Nuestros resultados han demostrado una media del número total relativo de  $5.6 \pm 0.6$  leucocitos por campo en los cortes de tejido gonadal de hembra del grupo control, mientras que se encontró una media de  $8.2 \pm 0.9$  leucocitos por campo en hembras tratadas sacarosa (2.6 leucocitos más que el grupo control), además de  $6.2 \pm 0.9$  leucocitos por campo en hembras tratadas con glucósidos de esteviol (0.6 leucocitos por campo más que el grupo control) y una media de  $8.0 \pm 0.7$  leucocitos por campo en hembras tratadas con sucralosa (2.4 leucocitos más que el grupo control) (**Figura 3A y B**). Por otro lado, se encontró una media de  $7.2 \pm 0.8$  leucocitos por campo en los cortes de tejido gonadal de macho del grupo control, de  $6.3 \pm 0.4$  adipocitos por campo en machos tratados sacarosa (0.9 leucocitos por campo menos que el grupo control), de  $2.7 \pm 0.5$  leucocitos por campo en machos tratados con glucósidos de esteviol (4.5 leucocitos menos que el grupo control) y de  $6.7 \pm 2.8$  leucocitos por campo en machos tratados con sucralosa (0.5 leucocitos menos que el grupo control) (**Figura 3A y B**).

Adicionalmente, nuestro análisis reporta una media total de  $6.0 \pm 0.2$  leucocitos por campo en los cortes de tejido mesentérico de hembra del grupo control, alrededor de  $8.6 \pm 0.9$  leucocitos por campo en hembras tratadas sacarosa (2.6 leucocitos más que el grupo control), de  $6.1 \pm 0.8$  leucocitos por campo en hembras tratadas con glucósidos

de esteviol ( $0.1$  leucocitos más que el grupo control) y de  $5.5 \pm 1.1$ ) leucocitos por campo en hembras tratadas con sucralosa ( $0.5$  leucocitos menos que el grupo control) **(Figura 4A y B)**. Por otro lado, se encontró una media del número total de  $3.5 \pm 0.5$  leucocitos por campo en los cortes de tejido mesentérico de macho del grupo control, de  $6.7 \pm 0.5$  leucocitos por campo en machos tratados sacarosa ( $3.2$  leucocitos más que el grupo control), sin embargo, en el grupo tratado con glucósidos de esteviol, logró cuantificarse una media de  $4.2 \pm 1.6$  leucocitos por campo ( $0.7$  leucocitos más que el grupo control) y de  $8.1 \pm 0.1$  leucocitos por campo en machos tratados con sucralosa ( $4.6$  leucocitos más que el grupo control) **(Figura 4C y D)**.

## **EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA LIPOCALINA-2 Y SU INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA**

Nuestros experimentos han demostrado la influencia del tratamiento a base de edulcorantes nutritivos (sacarosa) y no nutritivos (glucósidos de esteviol y sucralosa) en la intensidad media de fluorescencia (IMF) en la expresión de la proteína lipocalina 2 en tejido adiposo gonadal y mesentérico. Para determinar la expresión de la proteína y su IMF, utilizamos un microscopio de fluorescencia con el que se tomaron microfotografías (20X) utilizando los siguientes fluorocromos: Alexa Fluor 647 (rojo) como anticuerpo secundario para la proteína lipocalina 2 y DAPI (azul) para marcaje de DNA (núcleos). Las imágenes se analizaron a través del software NIS-ELEMENTS con unidades arbitrarias de fluorescencia obtenidas por los histogramas generados por el programa y así determinar la IMF.

Con eso, se logró demostrar un promedio de IMF de  $19.5 \pm 2.3$  unidades arbitrarias por campo en los cortes de tejido gonadal de hembra del grupo control, en contraste con  $25.8 \pm 3.7$  unidades por campo en hembras tratadas con sacarosa ( $6.3$  unidades más que el grupo control), de  $24.1 \pm 0.7$  unidades por campo en hembras tratadas con glucósidos de esteviol ( $4.6$  unidades por campo más que el grupo control) y de  $27.2 \pm 1$

unidades por campo en hembras tratadas con sucralosa (7.7 unidades más que el grupo control) **(Figura 5A y B)**.

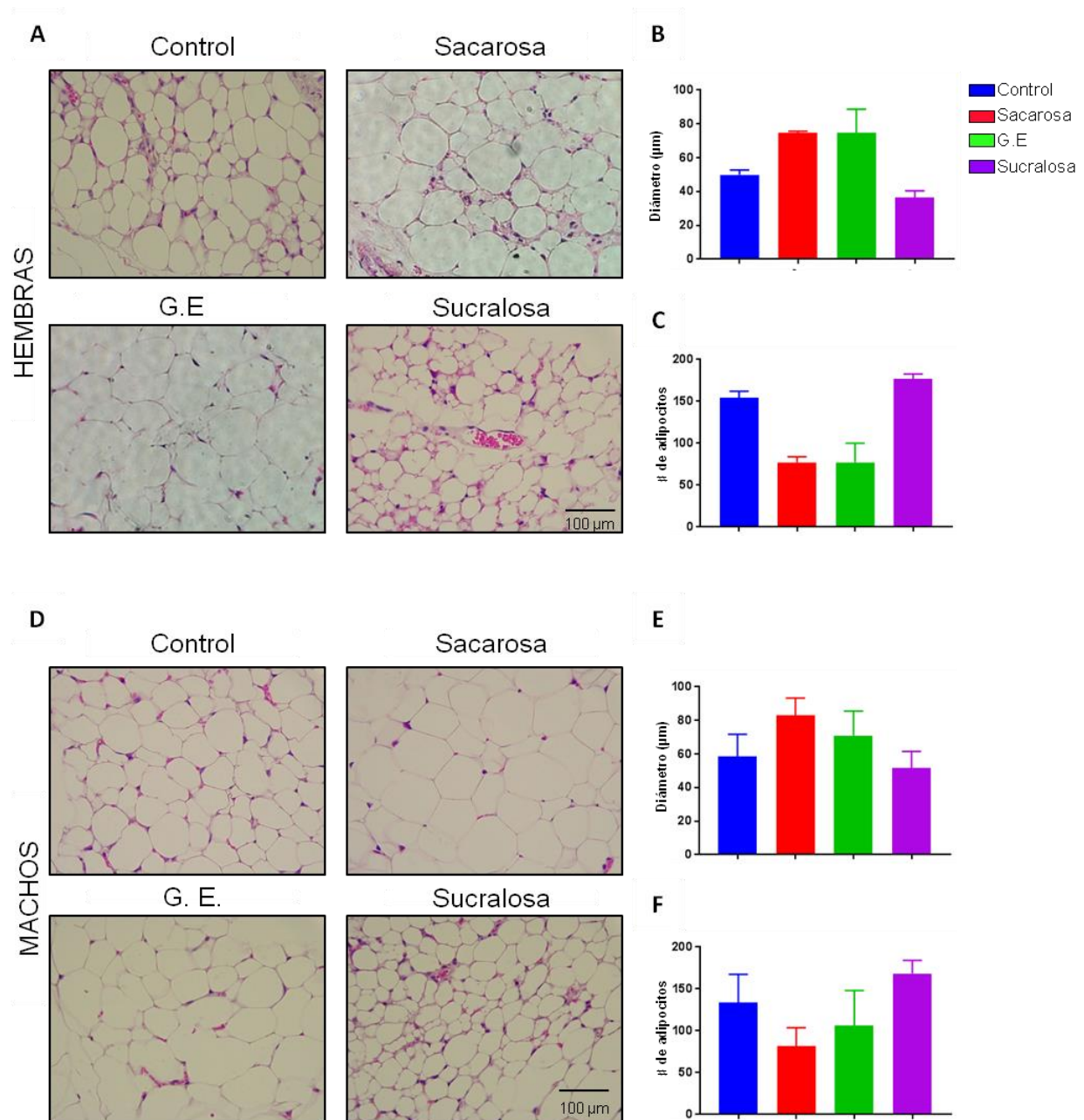
Por otro lado, el promedio de IMF fue de  $24.5 \pm 0.2$  unidades arbitrarias por campo en los cortes de tejido gonadal de macho del grupo control, contrastando los resultados de  $22.6 \pm 2.7$  unidades por campo en machos tratados sacarosa (1.9 unidades menos que el grupo control), de  $28.3 \pm 1.8$  unidades por campo en machos tratados con glucósidos de esteviol (3.8 unidades más que el grupo control) y de  $27.6 \pm 2.4$  unidades por campo en machos tratados con sucralosa (3.1 unidades más que el grupo control) **(Figura 6A y B)**.

Se encontró un promedio de IMF de  $42.6 \pm 1.6$  unidades arbitrarias por campo en los cortes de tejido mesentérico de hembra del grupo control, de  $24.8 \pm 1$  unidades por campo en hembras tratadas sacarosa (17.8 unidades menos que el grupo control), de  $26.9 \pm 0.8$  unidades por campo en hembras tratadas con glucósidos de esteviol (15.7 unidades por campo menos que el grupo control) y de  $22.1 \pm 0.9$  unidades por campo en hembras tratadas con sucralosa (20.5 unidades menos que el grupo control) **(Figura 7A y B)**.

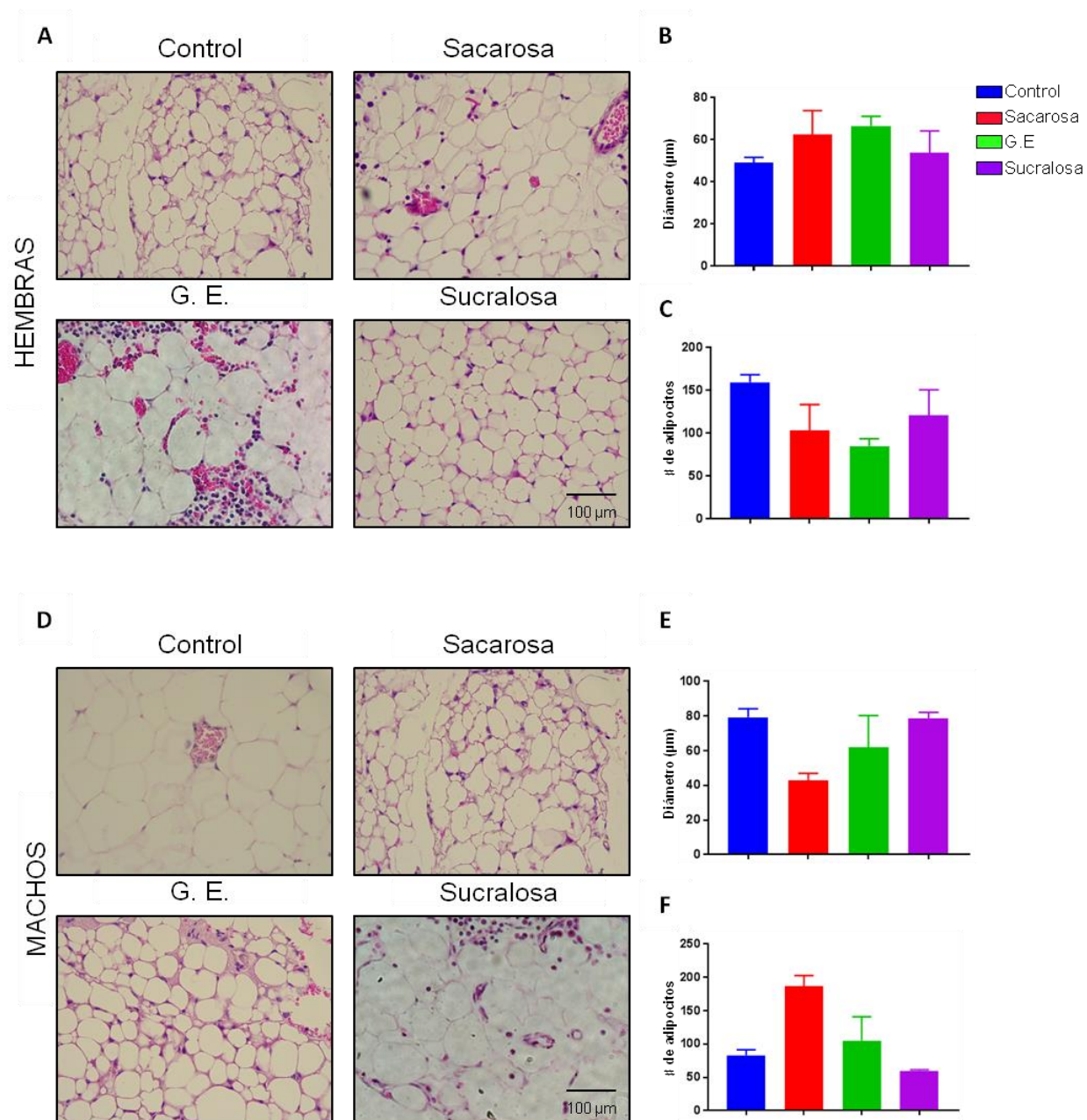
En el análisis de tejido adiposo mesentérico de machos, el promedio de IMF fue de  $25.4 \pm 1.6$  unidades arbitrarias por campo del grupo control, de  $25.1 \pm 1.1$  unidades por campo en machos tratados sacarosa (0.3 unidades menos que el grupo control), de  $22.7 \pm 0.8$  unidades por campo en machos tratados con glucósidos de esteviol (2.7 unidades menos que el grupo control) y de  $23 \pm 1$  unidades por campo en machos tratados con sucralosa (2.4 unidades menos que el grupo control) **(Figura 8A y B)**.

Adicionalmente, se llevaron a cabo controles de tinción **(Figura 9)**, control negativo con anticuerpo secundario de muestra de tejido adiposo **(Figura 9A)**, que demuestra ausencia de señal a falta de anticuerpo primario para lipocalina-2; control negativo (muestra de cerebro) y positivo (Islotes de Langerhans) de la expresión de la proteína lipocalina 2 **(Figura 9B y 9C)**.

## 10. FIGURAS Y LEYENDAS DE FIGURAS

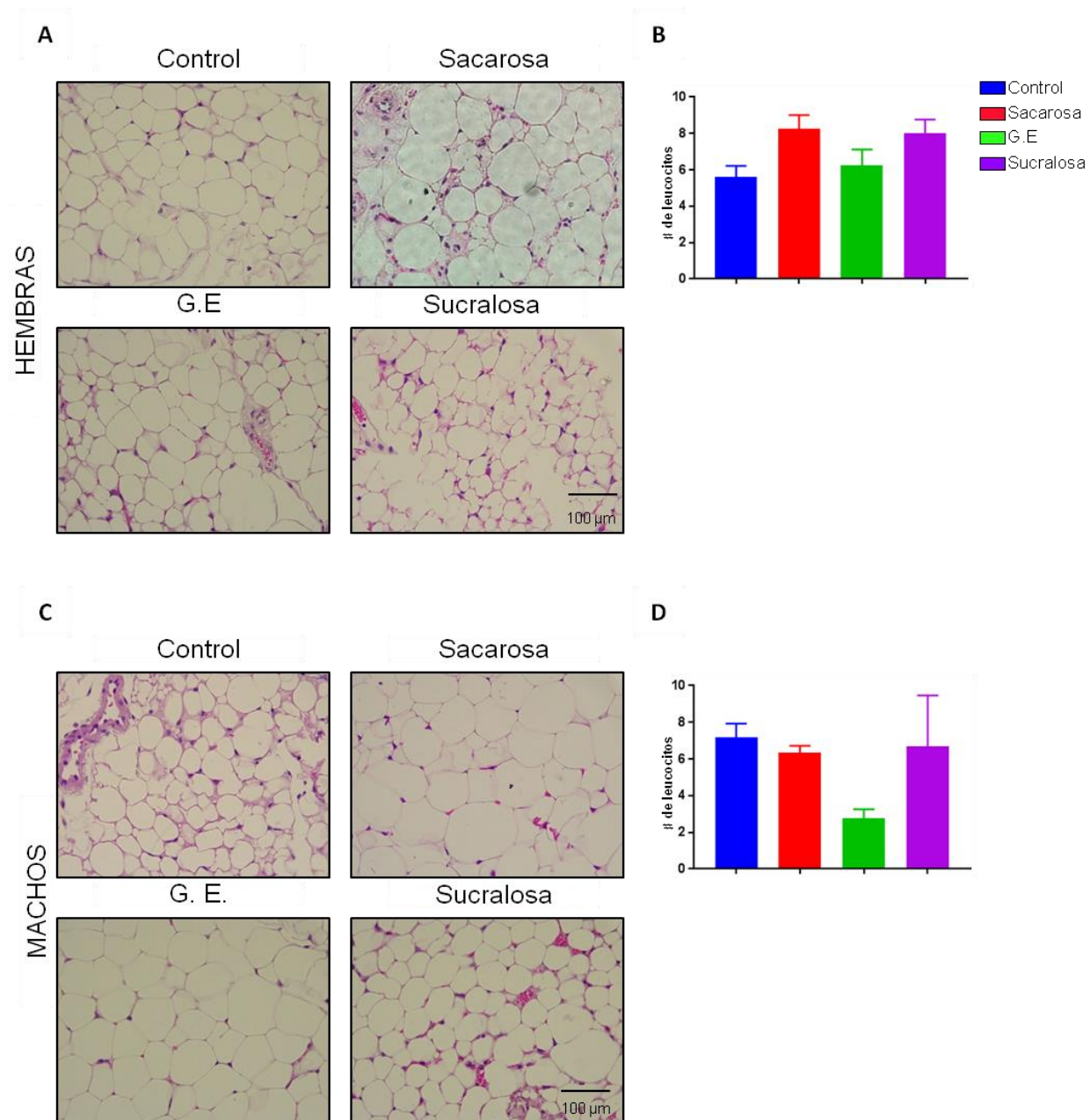


**Figura 1. Tamaño (diámetro;  $\mu\text{m}$ ) y número relativo de adipocitos en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales (hembras y machos). A y D) Cortes de tejido adiposo gonadal teñidos con hematoxilina y eosina y observados en microscopio óptico de campo claro (40X). B y E) Promedio de tamaño medio (diámetro;  $\mu\text{m}$ ) de adipocitos por campo. C y F) Promedio de número total de adipocitos por campo.  $n=3$  animales por grupo/sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.**



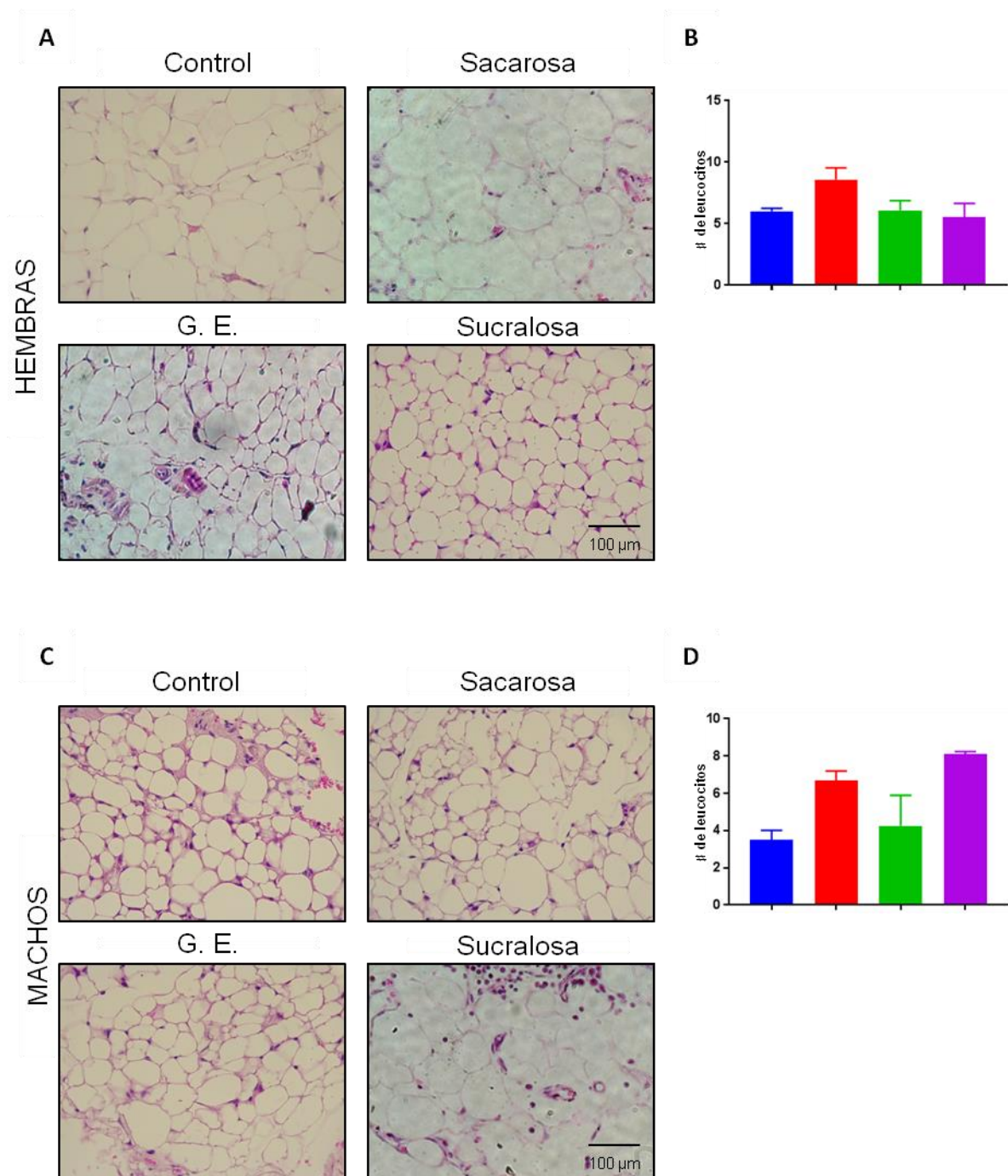
**Figura 2. . Tamaño (diámetro; µm) y número relativo de adipocitos en tejido adiposo mesentérico de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales (hembras y machos). A y D)** Cortes de tejido adiposo gonadal teñidos con hematoxilina y eosina y observados en microscopio óptico de campo claro (40X). **B y E)** Promedio de tamaño medio (diámetro; µm) de adipocitos por campo. **C y F)** Promedio de número total de adipocitos por campo. n=3 animales por grupo/sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media ± D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.



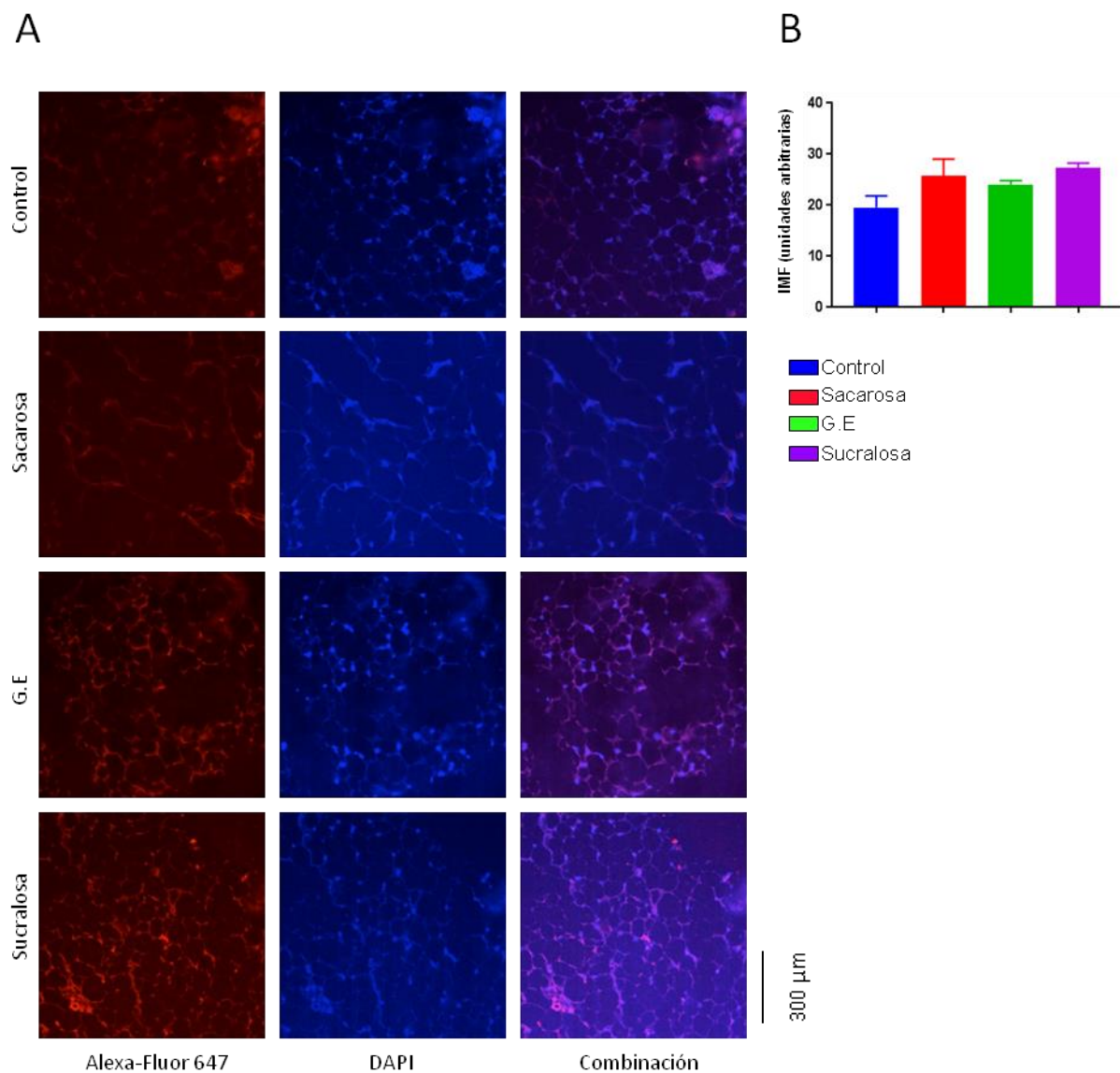


**Figura 3. Número relativo de leucocitos en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales (hembras y machos). A y C)** Cortes de tejido adiposo gonadal teñidos con hematoxilina y eosina y observados en microscopio óptico de campo claro (40X). **B y D)** Promedio del número relativo de leucocitos por campo. n=3 animales por grupo/sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.

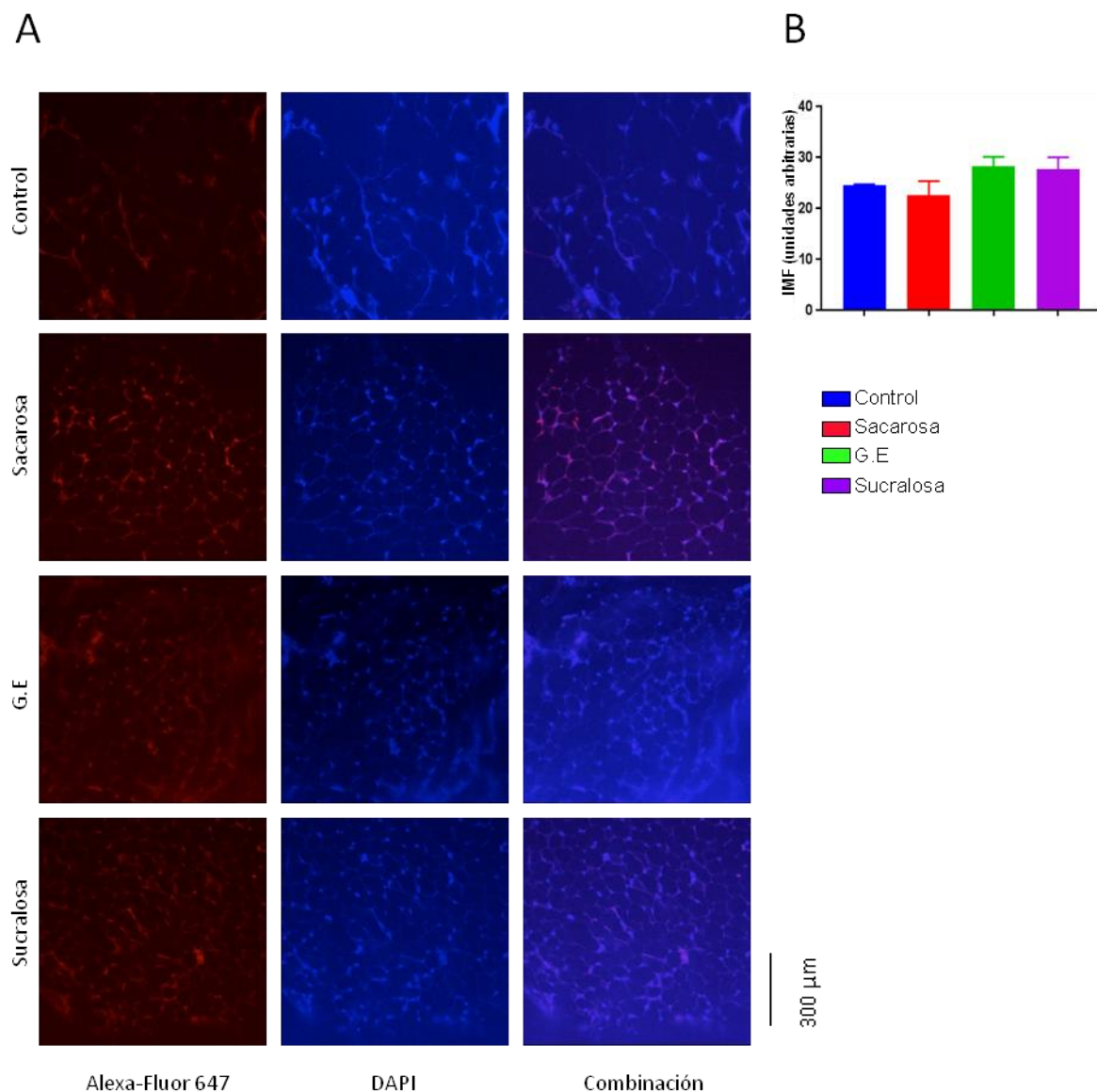




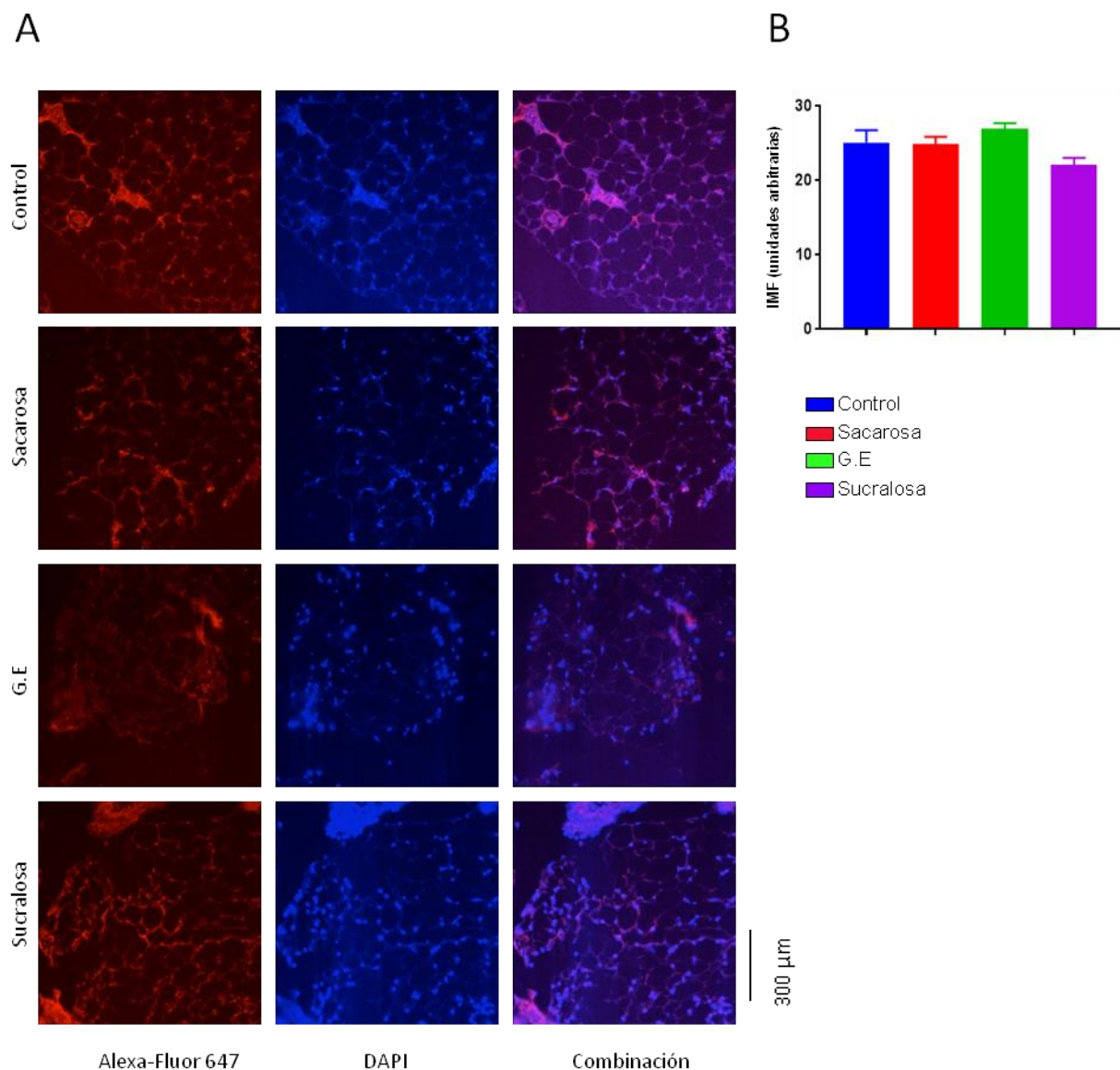
**Figura 4. Figura 3. Número relativo de leucocitos en tejido adiposo mesentérico de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales (hembras y machos). A y C)** Cortes de tejido adiposo gonadal teñidos con hematoxilina y eosina y observados en microscopio óptico de campo claro (40X). **B y D)** Promedio del número relativo de leucocitos por campo. n=3 animales por grupo/sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.



**Figura 5. Expresión de lipocalina 2 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c hembra suplementadas con edulcorantes comerciales. A)** Microscopia de fluorescencia para la detección de la expresión de Lipocalina-2 (Alexa Fluor 647) y núcleos (DAPI). Magnificación 20X. **B)** Promedio de la IMF (unidades arbitrarias) para el marcador de Lipocalina-2. n=3 por grupo /sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.

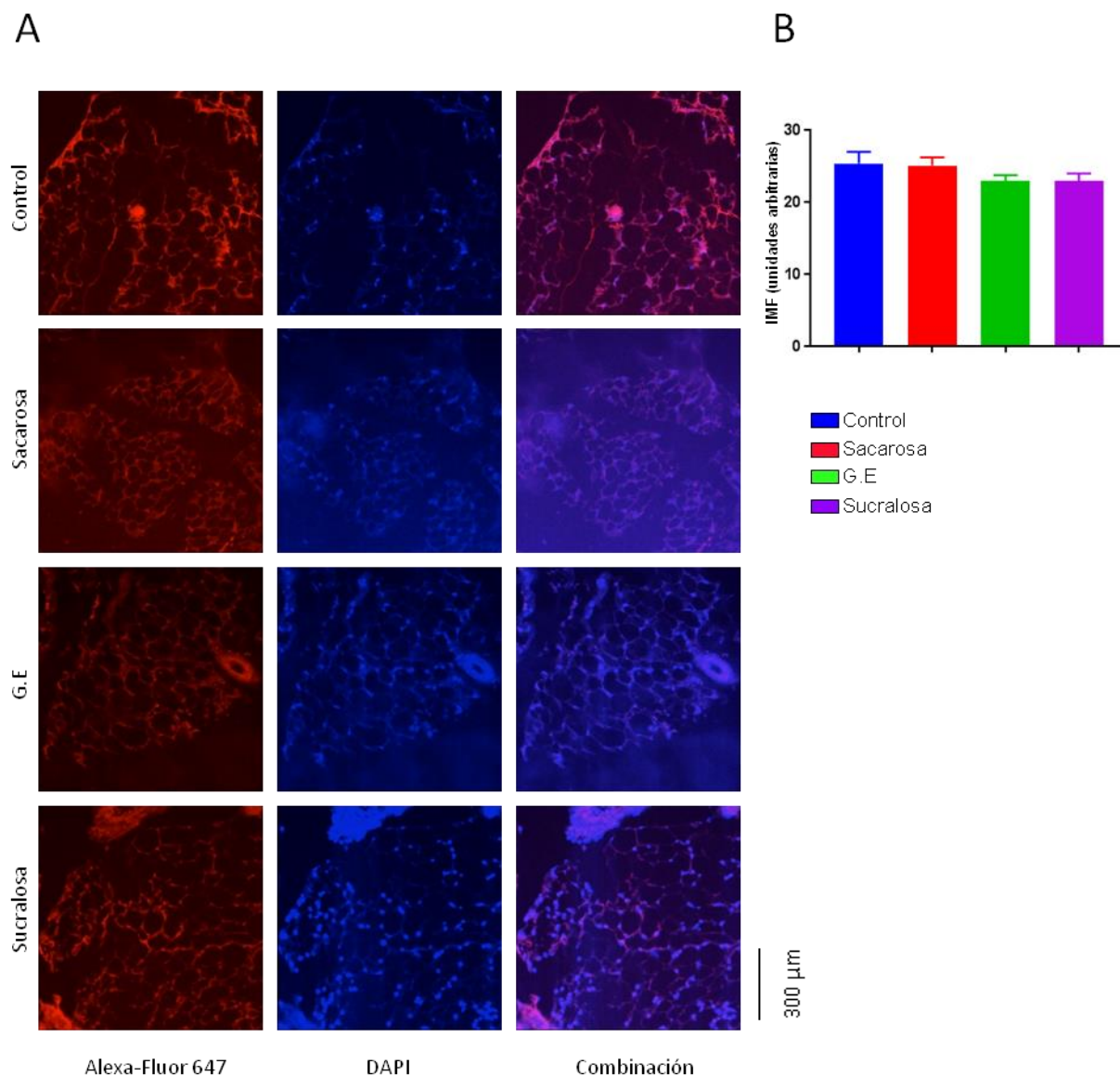


**Figura 6. Expresión de lipocalina 2 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c machos suplementados con edulcorantes comerciales.** **A)** Microscopia de fluorescencia para la detección de la expresión de Lipocalina-2 (Alexa Fluor 647) y núcleos (DAPI). Magnificación 20X. **B)** Promedio de la IMF (unidades arbitrarias) para el marcador de Lipocalina-2. n=3 por grupo /sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.

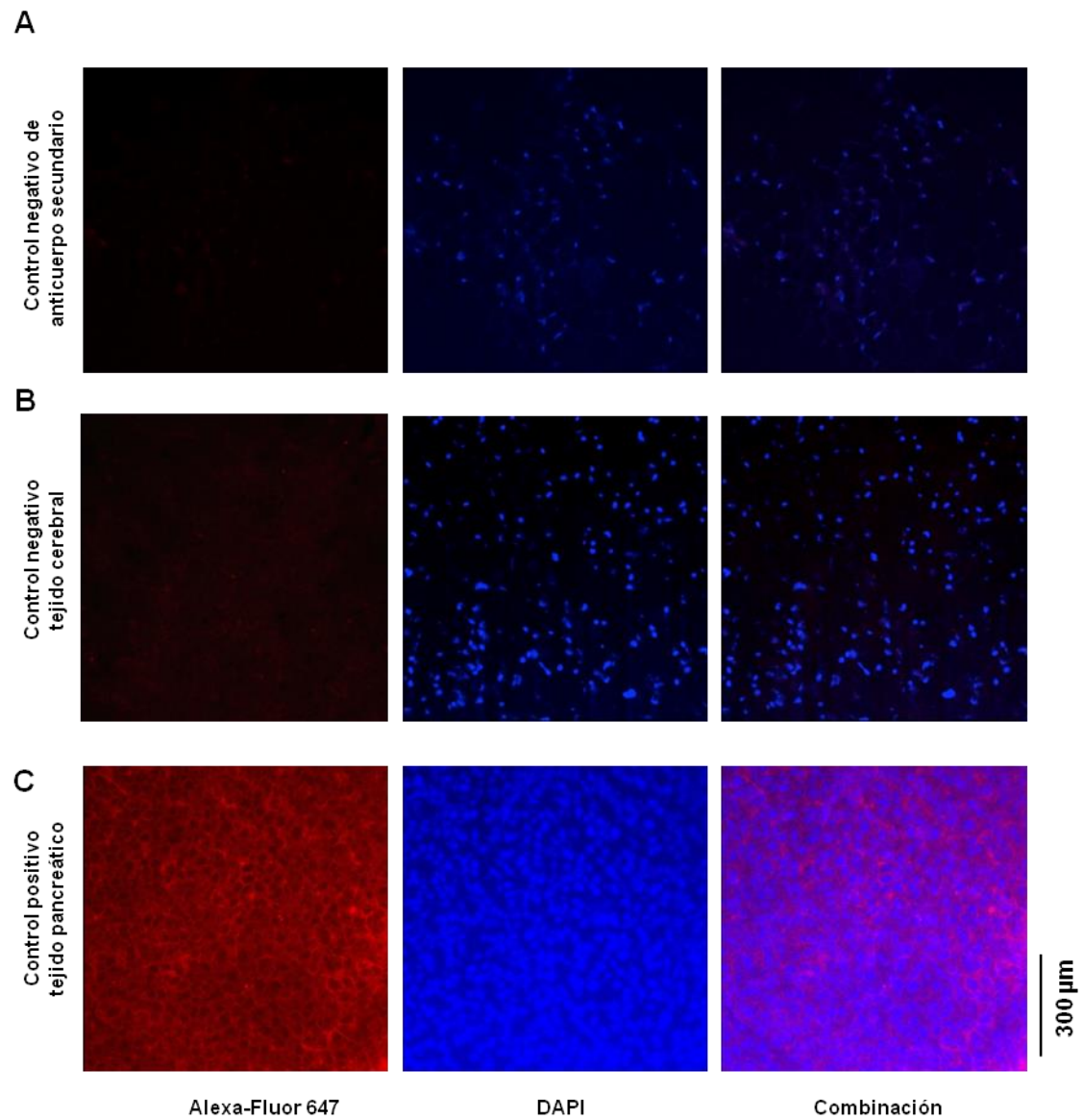


**Figura 7. Expresión de lipocalina 2 en tejido adiposo mesentérico de ratones BALB/c hembras suplementadas con edulcorantes comerciales.** **A)** Microscopia de fluorescencia para la detección de la expresión de Lipocalina-2 (Alexa Fluor 647) y núcleos (DAPI). Magnificación 20X. **B)** Promedio de la IMF (unidades arbitrarias) para el marcador de Lipocalina-2.  $n=3$  por grupo /sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.





**Figura 8. Expresión de lipocalina 2 en tejido adiposo mesentérico de ratones BALB/c machos suplementados con edulcorantes comerciales. A)** Microscopia de fluorescencia para la detección de la expresión de Lipocalina-2 (Alexa Fluor 647) y núcleos (DAPI). Magnificación 20X. **B)** Promedio de la IMF (unidades arbitrarias) para el marcador de Lipocalina-2. n=3 por grupo /sexo. 4 campos por individuo. Los datos se presentan en media  $\pm$  D.E. G.E. Glucósidos de esteviol.



**Figura 9: Controles de tinción (anticuerpo secundario) y controles positivos y negativos para lipocalina-2. A)** Control negativo de anticuerpo secundario (Alexa-Fluor 647). **B)** Control negativo para la expresión de lipocalina-2 (muestra de cerebro). **C)** Control positivo para la expresión de lipocalina-2 (muestra de páncreas).

## 11. DISCUSIÓN

Estudios aplicados de fisiología han demostrado la regulación del tamaño y número de adipocitos así como masa total de tejido adiposo por sistemas endocrinos y neurológicos a través de dos sistemas, a corto y largo plazo (6,7). Este estudio demuestra una tendencia a un mayor tamaño de adipocitos en tejido adiposo gonadal de machos y hembras tratados con sacarosa, y un menor tamaño en machos y hembras tratados con sucralosa, respecto al control, encontrándose una relación inversa con el número de adipocitos por campo con magnificación de 40X de microscopia óptica, explicando tal fenómeno probablemente por la mayor carga energética que aporta la sacarosa respecto a la mala absorción a través del tubo digestivo de la sucralosa aportando niveles bajos de energía de esta manera (8). No obstante, se ha observado un tamaño y número de adipocitos similares en machos y hembras tratados con glucósidos de esteviol, los cuales en teoría carecen de carga energética (14, 15, 16), probablemente debido a su conocido efecto estimulador de tolerancia a la insulina y potenciación de la misma (19, 28), lo cual podría inducir mayor acumulación de grasas en adipocitos a través de las vías de síntesis (29) y su lipogénesis subsecuente (30, 32).

Encontramos una diferencia en la hipertrofia de los adipocitos de tejido adiposo mesentérico en machos y hembras, demostrándose una tendencia de mayor tamaño de adipocitos en hembras tratadas con sacarosa y glucósidos de esteviol, al igual que el tejido gonadal (14); sin embargo, en machos se ha observado una relación inversa, con una tendencia para mayor tamaño de adipocitos en tejido mesentérico de individuos controles y tratados con sucralosa. Se conoce que el sexo masculino tiene una mayor predisposición por aumentar reservas grasas en tejido visceral, obteniendo una morfología androide en contraste con el sexo femenino, que tiene un mayor aumento de tejido gonadal y en zona glútea, obteniendo una morfología ginecoide (16). Esto podría indicar que el efecto estimulante de la insulina por parte de glucósidos de esteviol y sacarosa tiene una menor influencia sobre el tejido mesentérico de machos, mas no así de hembras (15).

Se ha observado un menor número de leucocitos en tejido adiposo gonadal de hembras del grupo control y tratadas con glucósidos de esteviol respecto al grupo tratado con sucralosa y sacarosa, probablemente debido al efecto antiinflamatorio de glucósidos de esteviol (19), explicando a su vez la mayor presencia de leucocitos en hembras tratadas con sacarosa por una probable mayor secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los adipocitos. Por otro lado, en hembras tratadas con sucralosa, su mayor número de leucocitos podría explicarse por el aumento de la carga osmótica a nivel intestinal, sin la propia estimulación de insulina (28), lo que a su vez podría ejercer efecto contrarregulador por hormonas reguladoras de la insulina (30), entre ellas glucagón, la cual puede ejercer un estado crónico de catabolismo y con ello disminución de tejido adiposo, no obstante con un aumento de producción de citocinas de los mismos. Es probable que la correlación entre andrógenos y estrógenos sea un factor determinante en el tamaño adipocítico a través de vías de señalización por IGF-1, influyendo a su vez en el sobrepeso, obesidad, y resistencia al insulina (36).

En contraste, en machos se ha encontrado una tendencia mucho menor de número de leucocitos del grupo tratado con glucósidos de esteviol, posiblemente explicado por un efecto antiinflamatorio superior del mismo en este tejido (19). Se ha determinado un mayor número de leucocitos en tejido adiposo mesentérico de hembras respecto a los demás grupos, probablemente debido al acumulo de grasas, lo que podría aumentar la secreción de adipocinas por parte de este tejido (38). No obstante, en machos se ha observado una tendencia mucho mayor en el grupo tratado con sacarosa y sucralosa (28, 29). En sacarosa, probablemente debido a el mayor cúmulo de reservas y secreción de adipocinas propio de los machos (40) y en sucralosa ,por el aumento en la función de las vías catabólicas del tejido (29). Sin embargo, también se ha observado un incremento leve de infiltrado leucocitario en el grupo tratado con glucósidos de esteviol respecto al grupo control, posiblemente debido a un efecto menor de la insulina promovido por los glucósidos de esteviol sobre el tejido mesentérico de machos, mencionado anteriormente como una posible influencia de la misma en el tamaño de los adipocitos en el tejido mesentérico de machos.



Diversos estudios demuestran la posibilidad de que los efectos propios de la lipocalina 2 se encuentren orientados hacia el estímulo antiinflamatorio, lo que se ha determinado *in vitro* a través de la inducción de la expresión de los genes de lipocalina 2 por TNF-alfa en la estirpe adipocítica 3T3-L1 (56). Por otro lado, se ha demostrado que la lipocalina 2 se encuentra en concentraciones altas en tejido inguinal adiposo en hembras obesas inducidas mediante una dieta alta en grasas, esto sugiere que puede tener efectos locales en el remodelado y metabolismo (57).

Por medio de inmunofluorescencia, determinamos una mayor tendencia de expresión de lipocalina 2 en tejido gonadal de hembras tratadas con edulcorantes, en comparación al grupo control; sin embargo, se observa mayor expresión en sacarosa y sucralosa, comparado con glucósidos de esteviol. Esto puede explicar el posible efecto contrarregulador del estado crónico de inflamación que se genera al consumir dichos edulcorantes (57). Sin embargo, se ha demostrado que la tendencia en machos muestra una distribución diferente, con un aumento de la expresión en glucósidos de esteviol y sucralosa, comparado con sacarosa, explicado probablemente por una menor reserva de grasas en el tejido adiposo de estos individuos, y con ellos una menor secreción de adipocinas pro inflamatorias o a una menor expresión de los genes de lipocalina por importancia secundaria de la misma en el remodelado de dicho tejido (58, 59).

Diversos estudios demuestran una mayor expresión de lipocalina en obesidad inducida por implementación de dieta alta en grasas, con una tendencia de expresión mayor en tejido adiposo gonadal que en mesentérico. Nuestro estudio ha demostrado una posible tendencia hacia a disminución en la expresión de lipocalina 2 en tejido adiposo mesentérico de machos y hembras tratados con edulcorantes respecto al grupo control, lo que quizá pueda indicar que el papel de lipocalina 2 en este tejido sea secundario, en su contraparte con tejido adiposo gonadal (58).

## **12. CONCLUSIONES**

Este estudio demostró la influencia de la alimentación a base de edulcorantes nutritivos (sacarosa) y no nutritivos (glucósidos de esteviol y sucralosa) en el tamaño y número de adipocitos de un modelo murino de la cepa BALB/c. Además, se ha demostrado la posible relación del tratamiento con edulcorantes en la intensidad de la expresión de la proteína lipocalina 2 en tejido adiposo. Se encontró una tendencia de mayor tamaño adipocítico en la suplementación con sacarosa y glucósidos de esteviol y una disminución del mismo en sucralosa; de forma contraria, se observó una disminución de leucocitos en el grupo suplementado con glucósidos de esteviol y aumentado en sucralosa y sacarosa. Asimismo, demostramos la influencia de estos compuestos en la expresión de lipocalina-2 a nivel de tejido adiposo, con una tendencia a mayor expresión en suplementación con sacarosa, y disminución con glucósidos de esteviol.

### 13. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nuestro estudio refleja resultados consistentes en su mayoría congruentes con investigaciones previamente realizadas, con la ventaja de incluir un espectro amplio de muestras y grupos, lo que ha orientado a una explicación integral de la respuesta del tejido adiposo al uso crónico de edulcorantes comerciales artificiales y naturales, nutritivos y no nutritivos a través de la cuantificación y medición de adipocitos y leucocitos e investigación de expresión tisular por inmunofluorescencia de la lipocalina-2; sin embargo, se necesita realizar esta investigación con un mayor número de individuos por grupo para demostrar el grado de significancia estadística de los resultados encontrados. Para este fin se necesita ampliar el número de individuos a un mínimo de 6 por grupo. Sumado a esto, sería de gran importancia en el futuro investigar mayores patrones moleculares y respuestas inmunitarias *in vivo* e *in vitro* del tejido adiposo de ratones suplementados y no suplementados.

## 14. BIBLIOGRAFIA

1. Organización mundial de la salud, enero 2017. Las 10 principales causas de defunción. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>.
2. Organización mundial de la salud. Prevención de las enfermedades crónicas. [http://www.who.int/chp/chronic\\_disease\\_report/part1/es/index4.html](http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/part1/es/index4.html).
3. Kjeldsen L, *et al.* Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J.Biol. Chem.* 268 (14): 10425-32.
4. Mattes R.D, *et al.* Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(1): 1-14.
5. García-Almeida J, *et al.* Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp.* 2013; 28:17.31.
6. Ganong W.F.& E. Kim Barret. "Fisiología Médica" 25ª ed. *McGraw Hill.* 2016.
7. Mattes R.D, *et al.* Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(1): 1-14.
8. Ebbeling C.B, *et al.* Effects of decreasing sugar-sweetened beverage consumption on body weight in adolescents: a randomized, controlled pilot study. *Pediatrics.* 2006; 117: 673-680.
9. Organización mundial de la salud. Global Health Observatory (GHO) data. <http://www.who.int/gho/en/>.
10. Organización mundial de la salud, 2014. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/es/>.
11. Organización mundial de la salud, marzo de 2013. Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020. [http://www.who.int/entity/cardiovascular\\_diseases/15032013\\_updated\\_revised\\_draft\\_action\\_plan\\_spanish.pdf?ua=1](http://www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf?ua=1).

12. Organización mundial de la salud. La obesidad entre los niños y los adolescentes se ha multiplicado por 10 en los últimos decenios. <http://www.who.int/end-childhood-obesity/es/>.
13. Obesidad y sobrepeso. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
14. Nijhuis J, *et al.* Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity Silver Spring*. 2009; 17: 2014-2018.
15. Mitsutomi K, *et al.* Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2014; 63: 69-78.
16. Goyal S.K, *et al.* Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener; a review. *International Journal of Food and Nutrition*. 2010; 61(1): 1-10.
17. Barriocanal L.A, *et al.* Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Jun; 51 (1): 37-41.
18. Misra H, *et al.* Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci* 3(2): 242-8.
19. Gupta E, *et al.* Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013; 7(46): 3343-3353.
20. Knight I, *et al.* The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 1994; 72 (4): 435-9.
21. Binns N. M. Sucralose: Alt sweeteners and light. *Nutr. Bull. BNF*. 2003; 29 (1): 53-8.
22. Campos M. B, *et al.* Aplicação de sucralose em iogurtes e preparados de frutas para iogurtes. *Food Ingredients*, 2000; 17: 18-21.
23. Mendel L. D, *et al.* Dental considerations in sucralose use. *J. Clin. Dent.* 13(3): 2002; 116-8.
24. Whitmore A. FDA approves new high-intensity sweeteners sucralose. *FDA Talk*, 16, 1998.

25. McNeil Nutritionals. *Splenda® Brand Sweetener: A guide for health care professionals*. Washington, McNeil Nutritionals, 2006.
26. Sims J, et al. The metabolic fate of sucralose in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2000; 38 (2): 115-21.
27. Sayer Ji. Splenda (Sucralose) Found to Have Diabetes- Promoting Effects. *GreenMedInfo LLC*, 2013.
28. Barianni –Rodero A, et al. Toxicity of Sucralose in Humans: A Review. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(1): 239-244.
29. Ross M.H. “Wojciech Pawlina. Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular”. 6ª ed. *Editorial Medica Panamericana*. 2013.
30. Malik S, et al. Ghrelin Modulates Brain Activity in Areas that Control Appetitive Behavior. *Cell Metabolism*. 2008; 7: 400-409.
31. Druker R, Regulación del apetito y control hormonal del peso corporal. *Fisiología Médica*. 1ª ed. *Manual Moderno*. 2005.
32. Ailhaud P, et al. Cellular and Molecular Aspects Of Adipose Tissue Development. *Annual Review of Nutrition*. 1992; 12: 207-233.
33. Álvarez Álvarez A, et al. Glucemia, insulinemia y secreción de insulina en ratas prepúberes hiperandrogenizadas e hipertrogenizadas. *Rev Cubana Endocrinol.* 2001 Abr. 12 (1). 42-48..
34. Reyne Y, et al. Differentiation of rabbit adipocyte precursor cells in a serum-free médium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1989; 25:747-52.
35. Schmidt W, et al. Adipose conversión of 3T3-L1 cells in a serum-free culture system depends on epidermal growth factor, insuline-like growth factor I, corticosterone, and cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 1990; 146:194-202.
36. Lozano Soto F. Introducción al sistema inmunológico, sus principales elementos y la respuesta inmunitaria. En Farreras; Rozman. *Medicina Interna* 17ª ed. *Elsevier*. 2012; 15: 2453-2488.
37. Vinay Kumar, Abul K. Abbas. *Patología Estructural y Funcional*. 9ª ed. *Elsevier*. 2015.

38. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's principles of Internal Medicine. Vol 1, 18<sup>a</sup> ed. *McGraw Hill*. 2012.
39. Guyton C. G. and Hall, J.E. Tratado de Fisiologia Medica, 12<sup>a</sup> ed. *Elsevier*, 2011.
40. Ham M, et al. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 2013; 33, 2425-2435.
41. Nijhuis J, et al. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity*. 2009; 17, 2014-2018.
42. Wu D, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively, activated macrophage associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011; 32, 243-247.
43. Satthaporn S, et al. Dendritic cells (I): biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 2001; 46: 9-20.
44. Bertola A, et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*. 2012; 61. 2238- 2247.
45. Bornstein S.R, et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human White and adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*. 2000; 49, 532-539.
46. Feuerer M, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 2009; 15, 930-939.
47. Deng T, et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity induced adipose inflammation. *Cell Metab.* 2013; 17, 411-422.
48. Hiroshi F, et al. *In vivo* Imaging of Obesity-induced inflammation in Adipose Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 391: 674-678
49. Hunter J, et al. Inflammation and Gunshot Wounds. London, J, Nicoli, 1794.
50. Gordon S, et al. Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 953.

51. Ivet E, *et al.* Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2012; 61: 1801-1813.
52. van der Heijden A, *et al.* High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015; 4: 256-267.
53. Jin Y.J, *et al.* Crosstalk between Adipocytes and Immune Cells in Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysregulation. *Mol cells*. 2014; 7: 30.
54. Flo T.H, *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004; 432: 917-921.
55. Devireddy L.R, *et al.* A cell surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005; 123: 1293-1305.
56. Catalan V, *et al.* Increased Adipose tissue expression of lipocalina-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *J Mol Med*. 2009; 87:803-213.
57. Hotamisligil G.S, *et al.* Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444: 860-867.
58. Lee M.J, *et al.* Adipose Tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13:371-376.
59. Sun K, *et al.* Adipose Tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121:2094-2101.
60. Hong G, *et al.* Evidence for the Regulatory Role of Lipocalin 2 in High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue Remodeling in Male Mice. *Endocrinology*. 2012; 154(10): 3525-3538.
61. Jinhui Z, *et al.* The Role of Lipocalin 2 in the Regulation of Inflammation in Adipocytes and Macrophages. *Molecular Endocrinology*. 2008; 22(6): 1416-1428.
62. Kjeldsen J, *et al.* Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10425-10432.
63. Jayaraman A, *et al.* Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a discriminatory marker of the hepatocyte- secreted protein response to IL-1B: a proteomic analysis. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91:502-515.



64. Yu W, *et al.* Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. *Clinical Chemistry*. 2007; 53(1): 34-41.
65. Daozhong J, *et al.* Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure, 2011; 25: 754-764.
66. Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles. Universidad Autónoma de Nuevo León. Disponible en: <http://oment.uanl.mx/cifras-de-sobrepeso-y-obesidad-en-mexico-ensanut-mc-2016/>.
67. Consumidor Ciudad de México: [http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos\\_04/edulcorantes\\_abr04.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_04/edulcorantes_abr04.pdf)
68. Swithers S.E, *et al.* Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2013, 24. 431–441.
69. Shankar P, *et al.* Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*. 2013; 29(11– 12):1293–9.
70. Meraz Ríos M.A, *et al.* Animales modificados genéticamente: La herramienta del futuro. *Revista Digital Universitaria*. 2001. 1(3). <http://www.revista.unam.mx/vol.1/num3/art3/>
71. Michael F.W, *et al.* Inbred Strains of Mice. University of Leicester, UK: Jackson Laboratory. 2007. [http://www.informatics.jax.org/inbred\\_strains/mouse/docs/BALB.shtml](http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/BALB.shtml).
72. Hanqing X, *et al.* Ratones y ratas de laboratorio. Princeton New Jersey, United States: Labome The World of laboratories 2012. <Http://www.labome.es/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>.
73. Riley L.K, *et al.* Development of a Performance Assessment Program for Research Animal Diagnostic Laboratories and Defining Microbiologic Testing Standards. *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats*. 1999; 7-13.

74. National Research. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 8ª ed. Institute of Laboratory Animals Resources. *The National Academies Press*. 2011.
75. Benavides F.J, *et al.* Manual de genética de roedores de laboratorio, principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. SECAL. *Laboratory Animals Ltd.* 2003; 115-125.
76. Maschi F, *et al.* El ratón BALB/c. Universidad Nacional de la Plata. 2011. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n3/maschi.html>.